

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-100318

(43)Date of publication of application : 05.04.2002

(51)Int.Cl.

H01J 49/26  
G01N 27/62  
H01J 49/10  
H01J 49/42

(21)Application number : 2001-175716

(71)Applicant : MICROMASS LTD

(22)Date of filing : 11.06.2001

(72)Inventor : BATEMAN ROBERT HAROLD  
KEVIN GILES

(30)Priority

Priority number : 2000 200014062

Priority date : 09.06.2000

Priority country : GB

2001 200101048

15.01.2001

2001 200105227

02.03.2001

GB

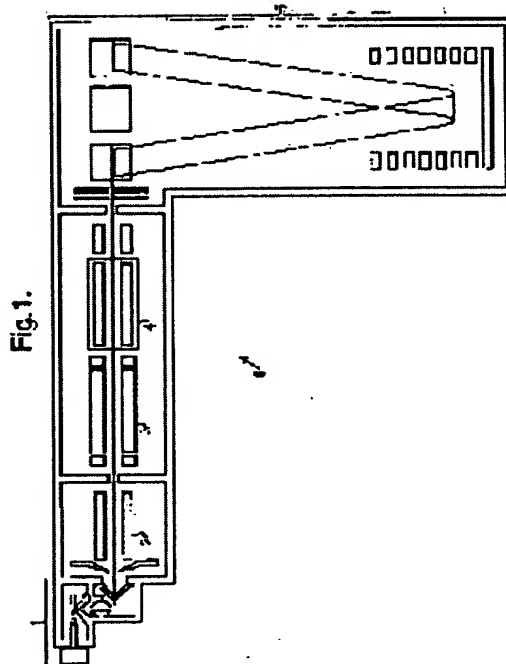
GB

## (54) MASS SPECTROMETRY AND DEVICE

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide an identifying method of a candidate parent ion suitable to identify the candidate parent ion in a real time and to use for a chromatography.

**SOLUTION:** An improving method of a parent ion scanning is disclosed. In one embodiment, a quadrupole mass filter 3 of an upstream of a collision cell 4 is arranged to work in a high pass mode. The parent ion passed the mass light filter 3 is fragmentized by a collision cell 4, and is discovered by an orthogonal type time of flight analyzer 5 to acquire daughter ion spectra. Ions having mass/charge ratio of not more than cutoff value of the mass light filter 3 are identified as the daughter ions, and the candidate parent ion is subsequently discovered, and by acquiring corresponding daughter ion spectra, their identifications can be confirmed. In the first embodiment, because the collision cell is switched in alternation in a space of a high or low fragmentation, and further, the candidate parent ion can be identified based on a dissipation of a prescribed ion or a neutral particle.



### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of

**BEST AVAILABLE COPY**

rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-100318

(P2002-100318A)

(43) 公開日 平成14年4月5日 (2002.4.5)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

H 0 1 J 49/26

G 0 1 N 27/62

識別記号

F I

H 0 1 J 49/26

G 0 1 N 27/62

特コード(参考)

5 C 0 3 8

H

K

L

X

審査請求 未請求 請求項の数67 O L 外国語出願 (全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-175716(P2001-175716)

(22) 出願日 平成13年6月11日(2001.6.11)

(31) 優先権主張番号 0 0 1 4 0 6 2 . 4

(32) 優先日 平成12年6月9日(2000.6.9)

(33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(31) 優先権主張番号 0 1 0 1 0 4 8 . 7

(32) 優先日 平成13年1月15日(2001.1.15)

(33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(31) 優先権主張番号 0 1 0 5 2 2 7 . 3

(32) 優先日 平成13年3月2日(2001.3.2)

(33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(71) 出願人 596142502

マイクロマス・リミテッド

Micromass Limited

イギリス国 エム23 9エルゼット マン

チェスター、ウィセンシャー、フローツ・

ロード (番地なし)

(72) 発明者 ロバート・ハロルド・ベイトマン

イギリス国チェシャー州 ダブリュ エー

16 8エヌ ビー, ナッツフォード, パー

クフィールド・ロード, パークフィール

ド・ハウス

(74) 代理人 110000028

特許業務法人 明成国際特許事務所

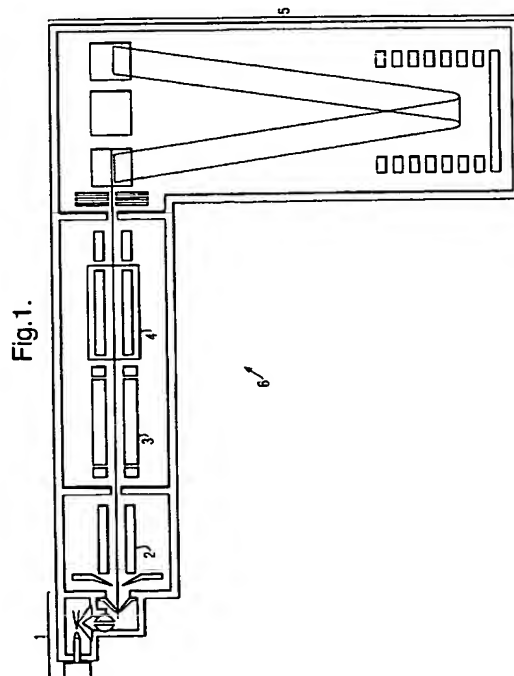
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 質量分析方法および装置

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 実時間で候補親イオンを同定し、クロマトグラフィに用いるのに適した候補親イオン同定方法を提供する。

【解決手段】 親イオン走査の改良方法が開示されている。1つの実施形態では、衝突セル4の上流の四重極質量フィルタ3がハイパスモードで動作するように配置されている。質量フィルタ3を通過した親イオンは、衝突セル4でフラグメント化され、娘イオンスペクトルを取得する直交型飛行時間分析器5により発見される。質量フィルタ3のカットオフ値未満の質量/電荷比を持つイオンを、娘イオンとして同定し、次いで、候補親イオンを発見し、対応する娘イオンのスペクトルを取得することによりそれらの同定を確認することができる。第1の実施形態では、衝突セルが高低のフラグメント化の間を交互に切り替わるため、更に、所定のイオンもしくは中性粒子の消失に基づき候補親イオンを同定することができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 質量分析方法であって、  
イオンを生成するイオン源（１）を設ける工程と、  
第 1 の範囲内の質量／電荷比を持つイオンが実質的に通  
過し、前記第 1 の範囲外の質量／電荷比を持つイオンの  
通過が実質的に減らされるように前記イオンをフィルタ  
リングする工程と、  
前記フィルタリングされたイオンの少なくとも一部がフ  
ラグメント化されて娘イオンを生成する第 1 のモードで  
動作されるフラグメント化手段（４）に、前記フィルタ  
リングされたイオンを送る工程と、  
前記第 1 のモードで動作する前記フラグメント化手段  
（４）を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量  
分析する工程とを含む、

更に、  
前記第 1 の範囲外の質量／電荷比を持つと決定されたイ  
オンの少なくとも一部を、娘イオンとして同定する工程  
を含むことを特徴とし、

1 つ以上の娘イオンが存在すると決定された場合に、前  
記方法は更に、前記 1 つ以上の娘イオンが 1 つ以上の所  
定の娘イオンに一致するか否かを決定する工程を含む、  
前記 1 つ以上の娘イオンが 1 つ以上の所定の娘イオンに  
一致すると決定された場合に、前記方法は更に、  
前記フィルタリングされたイオンのうち前記第 1 のモー  
ドよりも実質的に少ない量がフラグメント化される第 2  
のモードで、前記フラグメント化手段（４）を動作させ  
る工程と、

前記第 2 のモードで動作する前記フラグメント化手段  
（４）を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量  
分析する工程と、を含む、方法。

【請求項 2】 請求項 1 記載の質量分析方法であって、  
前記第 1 の範囲は可変である、方法。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 記載の質量分析方法で  
あって、

前記第 1 のモードで動作する前記フラグメント化手段  
（４）を通り抜けた前記イオンのうち少なくとも一部を  
質量分析する前記工程は、第 1 の質量スペクトルを取得  
する工程を含む、

前記第 2 のモードで動作する前記フラグメント化手段を  
通り抜けた前記イオンのうち少なくとも一部を質量分析  
する前記工程は、第 2 の質量スペクトルを取得する工程  
を含む、方法。

【請求項 4】 請求項 1、2 または 3 記載の質量分析方  
法であって、前記第 2 のモードで動作する前記フラグメ  
ント化手段（４）を通り抜けた前記イオンのうち少なく  
とも一部を質量分析する前記工程の後、前記方法は更  
に、少なくとも 1 つの候補親イオンを同定する工程を含  
む、方法。

【請求項 5】 請求項 3 に従属した場合の請求項 4 に記  
載の質量分析方法であって、前記第 1 の質量スペクトル

内の或る質量／電荷比を持つイオンの強度と前記第 2 の  
質量スペクトル内の同一の質量／電荷比を持つイオンの  
強度とを比較することにより、前記少なくとも 1 つの候  
補親イオンが同定される、方法。

【請求項 6】 請求項 4 または 5 記載の質量分析方法で  
あって、更に、

少なくとも 1 つの候補親イオンを含む第 2 の範囲内の質  
量／電荷比を持つイオンが実質的に前記フラグメント化  
手段（４）に到達するように構成され、前記第 2 の範囲  
外の質量／電荷比を持つイオンの通過が実質的に減らさ  
れるように、前記フラグメント化手段（４）の上流にお  
いて前記イオンをフィルタリングする工程と、

前記第 2 のモードよりも実質的に多くの前記イオンをフ  
ラグメント化させるように、前記フラグメント化手段  
（４）を動作させる工程と、

前記フラグメント化手段（４）を通り抜けた前記イオン  
の少なくとも一部を質量分析する工程と、を含む、方  
法。

【請求項 7】 請求項 6 記載の質量分析方法であって、  
候補親イオンの質量／電荷比の  $\pm x$  の質量／電荷比を持  
つイオンのみが実質的に前記フラグメント化手段（４）  
に到達するように、前記第 2 の範囲が選択され、 $x$  は  
（i）0.5、（ii）1.0、（iii）2.0、  
（iv）5.0、（v）10.0、（vi）15.0、  
（vii）20.0 のグループから選択される、方法。

【請求項 8】 請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の質  
量分析方法であって、前記イオン源（１）は、（i）エ  
レクトロスプレーイオン源、（ii）大気圧化学イオン  
化によるイオン源、（iii）マトリクス支援レーザー脱  
離イオン源、のグループから選択される、方法。

【請求項 9】 請求項 8 記載の質量分析方法であって、  
前記イオン源（１）に対して、液体クロマトグラフィに  
より混合物から分離された溶離物が、ある時間に渡って  
供給される、方法。

【請求項 10】 請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の  
質量分析方法であって、前記イオン源（１）は、（i）  
電気衝撃イオン源、（ii）化学イオン化によるイオン  
源、（iii）フィールドイオン化によるイオン源、の  
グループから選択される、方法。

【請求項 11】 請求項 10 記載の質量分析方法であっ  
て、前記イオン源（１）に対して、ガスクロマトグラフ  
ィにより混合物から分離された溶離物が、ある時間に渡  
って供給される、方法。

【請求項 12】 請求項 1 ないし 11 のいずれかに記載  
の質量分析方法であって、前記質量分析工程は、（i）  
四重極質量フィルタ、（ii）飛行時間型質量分析器、  
（iii）イオントラップ、（iv）磁場型質量分析  
器、（v）フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴  
（「FTICR」）質量分析器、のグループから選択さ  
れた分析器によって実行される、方法。

【請求項13】 請求項1ないし12のいずれかに記載の質量分析方法であって、前記フィルタリング工程は、多要素イオン光学レンズ(3)、好ましくは四重極ロッドセットによって実行される、方法。

【請求項14】 請求項13記載の質量分析方法であって、更に、前記多要素イオン光学レンズ(3)に高周波電界と直流電界の両方を供給する工程を含む、方法。

【請求項15】 請求項13または14記載の質量分析方法であって、前記多要素イオン光学レンズ(3)は、実質的に第1の値よりも大きい質量/電荷比を持つイオンのみを透過させるように構成される、方法。

【請求項16】 請求項15記載の質量分析方法であって、前記第1の値は、(i)100、(ii)150、(iii)200、(iv)250、(v)300、(vi)350、(vii)400、(viii)450、(ix)500、のグループから選択される、方法。

【請求項17】 請求項15または16記載の質量分析方法であって、娘イオンを同定する前記工程は、前記第1の値よりも小さい質量/電荷比を持つと決定された少なくとも一部のイオンを同定する工程を含む、方法。

【請求項18】 請求項1ないし17のいずれかに記載の質量分析方法であって、前記フラグメント化手段(4)は、(i)四重極ロッドセット、(ii)六重極ロッドセット、(iii)八重極ロッドセット、(iv)電極リングセット、のグループから選択された衝突セルを含む、方法。

【請求項19】 請求項18記載の質量分析方法であって、前記衝突セルは高周波のみのモードで動作される、方法。

【請求項20】 請求項18または19記載の質量分析方法であって、更に、 $10^{-4}$ から $10^{-1}$  mbarの範囲、好ましくは $10^{-3}$ から $10^{-2}$  mbarの範囲内の圧力で、前記衝突セルに衝突ガスを供給する工程を含む、方法。

【請求項21】 請求項18、19または20に記載の質量分析方法であって、前記衝突セルは十分に気密性の囲壁を形成する、方法。

【請求項22】 請求項1ないし21のいずれかに記載の質量分析方法であって、前記所定の娘イオンは、(i)ペプチド由来のインモニュウムイオン、(ii)リン酸化ペプチド由来のリン酸基 $\text{PO}_3^-$ イオンを含む官能基、(iii)特定の分子もしくは特定の種類の分子から分離し、続いて同定されることにより前記特定の分子もしくは前記特定の種類の分子の存在を示す質量タグ、のグループから選択されたイオ

ンを含む、方法。

【請求項23】 請求項1ないし22のいずれかに記載の質量分析方法であって、

前記第1のモードで前記フラグメント化手段(4)を動作させる工程は、(i)15V以上、(ii)20V以上、(iii)25V以上、(iv)30V以上、(v)50V以上、(vi)100V以上、(vii)150V以上、(viii)200V以上、のグループから選択された電圧を前記フラグメント化手段(4)に供給する工程を含む、方法。

【請求項24】 請求項1ないし23のいずれかに記載の質量分析方法であって、

前記第2のモードで前記フラグメント化手段(4)を動作させる工程は、(i)5V以下、(ii)4.5V以下、(iii)4V以下、(iv)3.5V以下、(v)3V以下、(vi)2.5V以下、(vii)2V以下、(viii)1.5V以下、(ix)1V以下、(x)0.5V以下、(xi)実質的に0V、のグループから選択された電圧を前記フラグメント化手段(4)に供給する工程を含む、方法。

【請求項25】 質量分析方法であって、イオンを生成するイオン源(1)を設ける工程と、100から500までの範囲の第1の値よりも大きい質量/電荷比を持つイオンのみが実質的に通過するように、前記イオンをフィルタリングする工程と、15V以上の電圧が印加され、前記フィルタリングされたイオンの少なくとも一部がフラグメント化されて娘イオンを生成する第1のモードで動作されるフラグメント化手段(4)に、前記フィルタリングされたイオンを送る工程と、

前記第1のモードで動作する前記フラグメント化手段(4)を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量分析する工程とを含み、更に、前記第1の値よりも小さい質量/電荷比を持つと決定されたイオンの少なくとも一部を、娘イオンとして同定する工程を含むことを特徴とし、1つ以上の娘イオンが存在すると決定された場合に、前記方法は更に、前記1つ以上の娘イオンが1つ以上の所定の娘イオンに一致するか否かを決定する工程を含み、前記1つ以上の娘イオンが1つ以上の所定の娘イオンに一致すると決定された場合に、前記方法は更に、5V以下の電圧が印加され、前記第1のモードよりも実質的に少ない前記イオンがフラグメント化される第2のモードで、前記フラグメント化手段(4)を動作させる工程と、前記第2のモードで動作する前記フラグメント化手段(4)を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量分析する工程と、を含む、方法。

【請求項26】 質量分析計であって、イオンを生成するためのイオン源(1)と、

第 1 の範囲内の質量／電荷比を持つイオンが実質的に通過し、前記第 1 の範囲外の質量／電荷比を持つイオンの通過が実質的に減らされるように、イオンをフィルタリングするための多要素イオン光学レンズ (3) と、フラグメント化手段 (4) であって、前記フラグメント化手段 (4) によって受け取られた前記イオンの少なくとも一部がフラグメント化され娘イオンを生成する第 1 のモードで動作するように構成され適合された、フラグメント化手段 (4) と、

前記第 1 のモードで動作する前記フラグメント化手段 (4) を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量分析するための質量分析器と、前記質量分析計を制御するための制御システムとを備え、

前記制御システムは、前記第 1 の範囲外の質量／電荷比を持つと決定された少なくともいくつかのイオンを娘イオンとして同定するように構成され、1 つ以上の娘イオンの存在が決定された場合、前記制御システムは前記 1 つ以上の娘イオンが 1 つ以上の所定の娘イオンに一致するか否かを決定し、前記 1 つ以上の娘イオンが 1 つ以上の所定の娘イオンに一致することを前記制御システムが決定した場合、前記制御システムは、前記フラグメント化手段 (4) によって受け取られた前記イオンの内、前記第 1 のモードよりも実質的に少ない量がフラグメント化される第 2 のモードで動作するように、前記フラグメント化手段 (4) を切り換え、前記質量分析器は、前記第 2 のモードで動作する前記フラグメント化手段 (4) を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量分析するように構成されていることを特徴とする、質量分析計。

【請求項 27】 請求項 26 記載の質量分析計であって、

前記質量分析器は、(i) 四重極質量フィルタ、(ii) 飛行時間型質量分析器、(iii) イオントラップ、(iv) 磁場型質量分析器、(v) フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (「FTICR」) 質量分析器、のグループから選択される、質量分析計。

【請求項 28】 請求項 26 または 27 記載の質量分析計であって、

前記多要素イオン光学レンズ (3) は四重極質量フィルタを備える、質量分析計。

【請求項 29】 請求項 26、27 または 28 に記載の質量分析計であって、

前記フラグメント化手段 (4) は、(i) 四重極ロッドセット、(ii) 六重極ロッドセット、(iii) 八重極ロッドセット、(iv) 電極リングセット、のグループから選択された衝突セルを備える、質量分析計。

【請求項 30】 請求項 29 記載の質量分析計であって、

前記衝突セルは十分に気密性の囲壁を形成する、質量分

析計。

【請求項 31】 質量分析計であって、

イオンを生成するためのイオン源 (1) と、

100 から 500 までの間の第 1 の値よりも大きい質量／電荷比を持つイオンが実質的に通過し、前記第 1 の値よりも小さい質量／電荷比を持つイオンの通過が実質的に減らされるように、イオンをフィルタリングするための多要素イオン光学レンズ (3) と、

フラグメント化手段 (4) であって、15 V 以上の電圧が印加され、前記フラグメント化手段 (4) により受け取られた前記イオンの少なくとも一部がフラグメント化されて娘イオンを生成する第 1 のモードで動作されるように構成され適合された、フラグメント化手段 (4) と、

前記第 1 のモードで動作する前記フラグメント化手段

(4) を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量分析するための質量分析器とを備え、

前記質量分析計は、前記第 1 の値よりも小さい質量／電荷比を持つと決定された少なくともいくつかのイオンを娘イオンとして同定するように構成されており、1 つ以上の娘イオンの存在が決定された場合、前記質量分析計は前記 1 つ以上の娘イオンが 1 つ以上の所定の娘イオンに一致するか否かを決定するよう構成され、前記 1 つ以上の娘イオンが 1 つ以上の所定の娘イオンに一致することが決定された場合、前記フラグメント化手段に 5 V 以下の電圧が印加され、前記フラグメント化手段 (4) によって受け取られた前記イオンの内、前記第 1 のモードよりも実質的に少ない量がフラグメント化される第 2 のモードで動作するよう前記フラグメント化手段 (4) を切り換えるように、前記質量分析計が構成および適合され、前記質量分析器は、前記第 2 のモードで動作する前記フラグメント化手段 (4) を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量分析するように構成されている、質量分析計。

【請求項 32】 請求項 1 ないし 25 のいずれかに記載の前記方法を実行するように構成および適合された、装置。

【請求項 33】 質量分析方法であって、

イオンを生成するイオン源 (1) を設ける工程を含み、更に、

前記イオンの少なくとも一部がフラグメント化されて娘イオンを生成する第 1 のモードと、前記第 1 のモードよりも実質的に少ない前記イオンがフラグメント化される第 2 のモードとで少なくとも動作するフラグメント化手段 (4) に、前記イオンを送る工程と、

前記第 1 のモードで動作する前記フラグメント化手段 (4) を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量分析する工程と、

前記第 2 のモードで動作する前記フラグメント化手段

(4) を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量

分析する工程と、

少なくとも1つの娘イオンと少なくとも1つの候補親イオンとを同定する工程と、

(i) 前記少なくとも1つの娘イオンが1つ以上の所定の娘イオンと一致するか否か、および/または、(ii) 前記少なくとも1つの娘イオンと前記少なくとも1つの候補親イオンが、所定のイオンもしくは中性粒子の消失により関連付けられる可能性があるか否か、を決定する工程と、

を含むことを特徴とする、方法。

【請求項34】 請求項33記載の質量分析方法であって、更に、

第1の範囲内の質量/電荷比を持つイオンが実質的に通過し、前記第1の範囲外の質量/電荷比を持つイオンの通過が実質的に減らされるように、前記フラグメント化手段(4)の上流で前記イオンをフィルタリングする工程、を含む、方法。

【請求項35】 請求項34記載の質量分析方法であって、前記第1の範囲は可変である、方法。

【請求項36】 請求項34または35記載の質量分析方法であって、

少なくとも1つの娘イオンを同定する前記工程は、前記第1の範囲外の質量/電荷比を持つ少なくとも一部のイオンを決定する工程を含む、方法。

【請求項37】 請求項33ないし36のいずれかに記載の質量分析方法であって、

前記第1のモードで動作する前記フラグメント化手段

(4)を通り抜けた前記イオンのうち少なくとも一部を質量分析する前記工程は、第1の質量スペクトルを取得する工程を含み、

前記第2のモードで動作する前記フラグメント化手段を通り抜けた前記イオンのうち少なくとも一部を質量分析する前記工程は、第2の質量スペクトルを取得する工程を含む、方法。

【請求項38】 請求項37記載の質量分析方法であって、

前記第1の質量スペクトル内の或る質量/電荷比を持つイオンの強度と前記第2の質量スペクトル内の同一の質量/電荷比を持つイオンの強度とを比較することにより、前記少なくとも1つの候補親イオンが同定される、方法。

【請求項39】 請求項37または38記載の質量分析方法であって、

前記第1の質量スペクトル内の或る質量/電荷比を持つイオンの強度と前記第2の質量スペクトル内の同一の質量/電荷比を持つイオンの強度とを比較することにより、前記少なくとも1つの娘イオンが同定される、方法。

【請求項40】 請求項33ないし39のいずれかに記

載の質量分析方法であって、

(i) 前記少なくとも1つの娘イオンが所定の娘イオンと一致すること、および/または、(ii) 前記少なくとも1つの娘イオンと前記少なくとも1つの候補親イオンが所定のイオンもしくは中性粒子の消失により関連付けられる可能性があること、が決定された場合、

更に、

少なくとも1つの候補親イオンを含む第2の範囲内の質量/電荷比を持つイオンが実質的に前記フラグメント化手段(4)に到達するように構成され、前記第2の範囲外の質量/電荷比を持つイオンの通過が実質的に減らされるように、前記フラグメント化手段(4)の上流において前記イオンをフィルタリングする工程と、

前記第2のモードよりも実質的に多くの前記イオンをフラグメント化させるように、前記フラグメント化手段(4)を動作させる工程と、

前記フラグメント化手段(4)を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量分析する工程と、を含む、方法。

【請求項41】 請求項40記載の質量分析方法であって、

候補親イオンの質量/電荷比の±xの質量/電荷比を持つイオンのみが実質的に前記フラグメント化手段(4)に到達するように、前記第2の範囲が選択され、xは(i) 0.5、(ii) 1.0、(iii) 2.0、(iv) 5.0、(v) 10.0、(vi) 15.0、(vii) 20.0のグループから選択される、方法。

【請求項42】 請求項33ないし41のいずれかに記載の質量分析方法であって、

前記イオン源(1)は、(i) エレクトロスプレーイオン源、(ii) 大気圧化学イオン化によるイオン源、(iii) マトリクス支援レーザー脱離イオン源、のグループから選択される、方法。

【請求項43】 請求項42記載の質量分析方法であって、

前記イオン源(1)に対して、液体クロマトグラフィによって混合物から分離された溶離物が、ある時間に渡って供給される、方法。

【請求項44】 請求項33ないし41のいずれかに記載の質量分析方法であって、

前記イオン源(1)は、(i) 電気衝撃イオン源、(ii) 化学イオン化によるイオン源、(iii) フィールドイオン化によるイオン源、のグループから選択される、方法。

【請求項45】 請求項44記載の質量分析方法であって、

前記イオン源(1)に対して、ガスクロマトグラフィにより混合物から分離された溶離物が、ある時間に渡って供給される、方法。

【請求項46】 請求項33ないし45のいずれかに記

載の質量分析方法であって、  
前記質量分析工程は、(i) 四重極質量フィルタ、(i i) 飛行時間型質量分析器、(i i i) イオントラップ、(i v) 磁場型質量分析器、(v) フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (「FTICR」) 質量分析器、のグループから選択された分析器によって実行される、方法。

【請求項 47】 請求項 34 または 40 に従属した場合の請求項 34 ないし 46 のいずれかに記載の質量分析方法であって、

前記フィルタリング工程は、多要素イオン光学レンズ (3)、好ましくは四重極質量フィルタによって実行される、方法。

【請求項 48】 請求項 47 記載の質量分析方法であって、更に、

前記多要素イオン光学レンズ (3) に高周波電界と直流電界の両方を供給する工程を含む、方法。

【請求項 49】 請求項 47 または 48 記載の質量分析方法であって、

前記多要素イオン光学レンズ (3) は、実質的に第 1 の値よりも大きい質量/電荷比を持つイオンのみが通過するように構成される、方法。

【請求項 50】 請求項 49 記載の質量分析方法であって、

前記第 1 の値は、(i) 100、(i i) 150、(i i i) 200、(i v) 250、(v) 300、(v i) 350、(v i i) 400、(v i i i) 450、(i x) 500 のグループから選択される、方法。

【請求項 51】 請求項 49 または 50 記載の質量分析方法であって、

娘イオンを同定する前記工程は、前記第 1 の値よりも小さい質量/電荷比を持つと決定された少なくとも一部のイオンを同定する工程を含む、方法。

【請求項 52】 請求項 33 ~ 51 すべてに記載の質量分析方法であって、

前記フラグメント化手段 (4) は、(i) 四重極ロッドセット、(i i) 六重極ロッドセット、(i i i) 八重極ロッドセット、(i v) 電極リングセット、のグループから選択された衝突セルを含む、方法。

【請求項 53】 請求項 52 記載の質量分析方法であって、

前記衝突セルは高周波のみのモードで動作される、方法。

【請求項 54】 請求項 52 または 53 記載の質量分析方法であって、更に、

$10^{-3}$  から  $10^{-1}$  mbar の範囲、好ましくは  $10^{-3}$  から  $10^{-2}$  mbar の範囲内の圧力で、前記衝突セルに衝突ガスを供給する工程を含む、方法。

【請求項 55】 請求項 52、53 または 54 すべてに記載の質量分析方法であって、

前記衝突セルは十分に気密性の囲壁を形成する、方法。

【請求項 56】 請求項 33 ないし 55 のいずれかに記載の質量分析方法であって、

前記所定の娘イオンは、(i) ペプチド由来のインモニウムイオン、(i i) リン酸化ペプチド由来のリン酸基  $\text{PO}_3^-$  イオンを含む官能基、(i i i) 特定の分子もしくは特定の種類の分子から分離し、続いて同定されることにより前記特定の分子もしくは前記特定の種類の分子が存在することを示す質量タグ、のグループから選択されたイオンを含む、方法。

【請求項 57】 請求項 33 ないし 56 のいずれかに記載の質量分析方法であって、

前記第 1 のモードで前記フラグメント化手段 (4) を動作させる工程は、(i) 15V 以上、(i i) 20V 以上、(i i i) 25V 以上、(i v) 30V 以上、(v) 50V 以上、(v i) 100V 以上、(v i i) 150V 以上、(v i i i) 200V 以上、のグループから選択された電圧を前記フラグメント化手段 (4) に供給する工程を含む、方法。

【請求項 58】 請求項 33 ~ 57 すべてに記載の質量分析方法であって、

前記第 2 のモードで前記フラグメント化手段 (4) を動作させる工程は、(i) 5V 以下、(i i) 4.5V 以下、(i i i) 4V 以下、(i v) 3.5V 以下、(v) 3V 以下、(v i) 2.5V 以下、(v i i) 2V 以下、(v i i i) 1.5V 以下、(i x) 1V 以下、(x) 0.5V 以下、(x i) 実質的に 0V、のグループから選択された電圧を前記フラグメント化手段 (4) に供給する工程を含む、方法。

【請求項 59】 質量分析方法であって、イオンを生成するイオン源 (1) を設ける工程を含み、更に、

15V 以上の電圧が印加され、前記イオンの少なくとも一部がフラグメント化されて娘イオンを生成する第 1 のモードと、5V 以下の電圧が印加され、前記第 1 のモードよりも実質的に少ない前記イオンがフラグメント化される第 2 のモードとで少なくとも動作するフラグメント化手段 (4) に、前記イオンを送る工程と、

前記第 1 のモードで動作する前記フラグメント化手段 (4) を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量分析する工程と、

前記第 2 のモードで動作する前記フラグメント化手段 (4) を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量分析する工程と、

少なくとも 1 つの娘イオンと少なくとも 1 つの候補親イオンを同定する工程と、

(i) 前記少なくとも 1 つの娘イオンが 1 つ以上の所定の娘イオンと一致するか否か、および/または、(i i) 前記少なくとも 1 つの娘イオンと前記少なくとも 1 つの候補親イオンが所定のイオンもしくは中性粒子の消

失により関連付けられる可能性があるか否か、を決定する工程と、を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 60】 質量分析計であって、イオンを生成するためのイオン源（１）と、フラグメント化手段（４）であって、前記フラグメント化手段（４）によって受け取られた前記イオンの少なくとも一部がフラグメント化されて娘イオンを生成する第１のモードと、前記第１のモードよりも実質的に少ない前記イオンがフラグメント化される第２のモードの間で切り換え可能なフラグメント化手段（４）と、前記第１のモードで動作する前記フラグメント化手段（４）を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量分析するため、および、前記第２のモードで動作する前記フラグメント化手段（４）を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量分析するための質量分析器と、前記質量分析計を制御するための制御システムと、を備え、前記制御システムは、少なくとも１つの娘イオンと少なくとも１つの候補親イオンを同定し、（ｉ）前記少なくとも１つの娘イオンが１つ以上の所定の娘イオンと一致する  
10 20 25 30 35 40 45 50

【請求項 61】 請求項 60 記載の質量分析計であって、前記質量分析器は、（ｉ）四重極質量フィルタ、（ｉｉ）飛行時間型質量分析器、（ｉｉｉ）イオントラップ、（ｉｖ）磁場型質量分析器、（ｖ）フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴（「FTICR」）質量分析器のグループから選択される、質量分析計。

【請求項 62】 請求項 60 または 61 記載の質量分析計であって、更に、第１の範囲内の質量／電荷比を持つイオンが実質的に通過し、前記第１の範囲外の質量／電荷比を持つイオンの通過が実質的に減らされるように、イオンをフィルタリングするための多要素イオン光学レンズ（３）を備える、質量分析計。

【請求項 63】 請求項 62 記載の質量分析計であって、前記多要素イオン光学レンズ（３）は四重極質量フィルタを備える、質量分析計。

【請求項 64】 請求項 60～63 すべてに記載の質量分析計であって、前記フラグメント化手段（４）は、（ｉ）四重極ロッドセット、（ｉｉ）六重極ロッドセット、（ｉｉｉ）八重極ロッドセット、（ｉｖ）電極リングセット、のグループから選択された衝突セルを含む、質量分析計。

【請求項 65】 請求項 64 記載の質量分析計であつ

て、前記衝突セルは十分に気密性の囲壁を形成する、質量分析計。

【請求項 66】 質量分析計であって、イオンを生成するためのイオン源（１）と、フラグメント化手段（４）であって、15V以上の電圧が印加され、前記フラグメント化手段（４）によって受け取られた前記イオンの少なくとも一部がフラグメント化されて娘イオンを生成する第１のモードと、5V以下の電圧が印加され、前記第１のモードよりも実質的に少ない前記イオンがフラグメント化される第２のモードの間で切り換え可能なフラグメント化手段（４）と、前記第１のモードで動作する前記フラグメント化手段（４）を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量分析するとともに、前記第２のモードで動作する前記フラグメント化手段（４）を通り抜けた前記イオンの少なくとも一部を質量分析するための質量分析器と、を備え、前記質量分析計は、少なくとも１つの娘イオンと少なくとも１つの候補親イオンを同定し、（ｉ）前記少なくとも１つの娘イオンが１つ以上の所定の娘イオンと一致する  
10 20 25 30 35 40 45 50

【請求項 67】 請求項 33 ないし 59 のいずれかの前記方法を実行するように構成および適合された装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、質量分析方法および装置に関する。

【0002】

【従来の技術】タンデム質量分析（MS/MS）とは、質量分析方法の名称であり、その方法においては、サンプルから生成された親イオンが、第１の質量フィルタ／分析器によって選抜された後に衝突セルに通され、中性ガス分子との衝突によってフラグメント化され、娘（すなわち「生成」）イオンを生じる。次に、娘イオンは、第２の質量フィルタ／分析器によって質量分析され、娘イオンスペクトルの結果は、親（すなわち「前駆」）イオンの構造決定に用いることができる。質量スペクトル分析の前に化学的洗浄の必要がないため、タンデム質量分析は特に、生体分子のような複雑な混合物の分析に有用である。

【0003】タンデム質量分析法の一形態として親イオン走査法と呼ばれる方法が知られており、その方法の第１の工程では、第２の質量フィルタ／分析器が質量フィルタとして働くように配置され、特定の質量／電荷比を持つ娘イオンのみを通過させ、検出するようになってい

る。その質量／電荷比は、特定の親イオンもしくは特定の種類の親イオンのフラグメント化から生成する固有の生成物であることが知られている娘イオンの質量／電荷比と一致するように決定される。次に、衝突セルの上流にある第1の質量フィルタ／分析器が走査され、第2の質量フィルタ／分析器はその特定の質量／電荷比を持つ娘イオンの存在を続けてモニタリングする。そして、固有の娘イオンを生じる親イオンの質量／電荷比を決定することができる。次に、第2の工程として、特定の質量／電荷比を選択するように第1のフィルタ／分析器を動作させ、完全な娘イオンスペクトルを記録するために第2の質量フィルタ／分析器を走査することにより、固有の娘イオンを生成する親イオンの質量／電荷比それぞれに対する完全な娘イオンスペクトルを得ることができる。この工程は、目的とするその他の親イオンに対して繰り返すことができる。例えば、生体分子のエレクトロスプレー質量スペクトル内で高頻度に遭遇する化学的なノイズのために直接の質量スペクトル内で親イオンを同定できない場合には、 $Pt$ イオン走査法が有用である。

【0004】第1の四重極質量フィルタ／分析器と、衝突ガスが導入される四重衝突セルと、第2の四重極質量フィルタ／分析器とを備える三連四重極質量分析計がよく知られている。他の型の質量分析計としてはハイブリッド四重極飛行時間型質量分析計が知られているが、これは、直交型の飛行時間型分析器が第2の四重極質量フィルタ／分析器に置き換わったものである。

【0005】以下に示すように、親イオン走査に続いて候補親イオンの娘イオンスペクトルを取得する従来の方法を実行する際には、両方の型の質量分析計は、デューティサイクル（使用率）が低いため、高いデューティサイ

クルを必要とする用途、すなわちオンラインクロマトグラフィでの利用には適さないという欠点がある。

【0006】四重極は、質量フィルタとして用いられる場合には、約100%のデューティサイクルを持つが、例えばピークのベースが1質量単位幅である500質量単位の質量範囲を質量分析するために走査モードで質量分析器として用いられる場合には、デューティサイクルが約0.1%に減少する。

【0007】直交加速型飛行時間分析器のデューティサイクルは通例、1～20%の範囲であり、スペクトル内の異なるイオンの相対 $m/z$ 値に依存する。しかしながら、デューティサイクルは同様に、飛行時間型分析器が、特定の質量／電荷比をもつイオンを通過させるために質量フィルタとして用いられているか、完全な質量スペクトルを記録するために用いられているかということには依存しない。これは、飛行時間型分析器の動作の特性による。娘イオンのスペクトルを取得し記録する際には、飛行時間型分析器のデューティサイクルは約5%が通例である。

【0008】第1次近似では、三連四重極質量分析計を

用いて候補親イオンを発見するために探索する際の一般的なデューティサイクルは、約0.1%である（第1の四重極質量フィルタ／分析器は0.1%のデューティサイクルで走査され、第2の四重極質量フィルタ／分析器は100%のデューティサイクルで質量フィルタとして働く）。特定の候補親イオンに対して娘イオンのスペクトルを取得する際のデューティサイクルも、約0.1%である（第1の四重極質量フィルタ／分析器は100%のデューティサイクルで質量フィルタとして働き、第2の四重極質量フィルタ／分析器は約0.1%のデューティサイクルで走査される）。その結果、多数の候補親イオンを発見し、候補親イオンの一つの娘イオンスペクトルを生成する際のデューティサイクルは、0.1%/2（各段階のデューティサイクルが0.1%である二段階工程であるため）、すなわち0.05%となる。

【0009】候補親イオンを発見するための四重極飛行時間型質量分析計のデューティサイクルは、約0.005%である（四重極は約0.1%のデューティサイクルで走査され、飛行時間型分析器は約5%のデューティサイクルで質量フィルタとして働く。候補親イオンが発見されれば、候補親イオンの娘イオンスペクトルを5%のデューティサイクルで取得することができる（四重極は約100%のデューティサイクルで質量フィルタとして働き、飛行時間型分析器は5%のデューティサイクルで走査される）。その結果、多数の候補親イオンを発見し、候補親イオンの一つの娘イオンスペクトルを生成する際のデューティサイクルは、0.005%となる（何故なら0.005%<5%）。

【0010】そのように、三連四重極のデューティサイクルは、親イオン走査の従来の方法を行い発見された候補親イオンの確証的な娘イオンスペクトルを取得するための四重極飛行時間型質量分析計よりも約1桁大きい。しかしながら、そのデューティサイクルの大きさは、イオン源がクロマトグラフィ装置からの溶離物である場合に必要ない実時間データの分析に実践的かつ有効に用いるには十分でない。

【0011】エレクトロスプレーとレーザ脱離技術が、非常に大きな分子量を持つ分子イオンの生成を可能にしたのだが、飛行時間型質量分析器は、完全な質量スペクトルを高い効率で記録できるため、そのような質量の大きい生体分子の分析に有利である。また、分解能と質量精度も高い。

【0012】四重極イオントラップのような他の形態の質量分析器は、飛行時間型分析器と同様に連続的な出力を提供することができないなど、いくつかの点で飛行時間型分析器と同様であり、従来の親イオン走査法の重要な側面である連続的にイオンを通過させる質量フィルタとして用いる場合には効率が低い。飛行時間型質量分析器と四重極イオントラップは、「不連続出力の質量分析器」と呼ぶことができる。

10

20

30

40

50

【0013】それ故、質量分析の改良方法および装置を提供し、好ましい実施形態により、実時間でクロマトグラフィに用いるのに適する従来の方法よりも迅速に候補親イオンを同定できる改良方法を提供することが望まれている。

#### 【0014】

【発明の概要】本発明の第1の実施形態と第1の態様によると、請求項1記載の質量分析方法が提供される。

【0015】本発明の好ましい実施形態によると、候補親イオンを発見する第1の工程を2.5%のデューティサイクルで実行することができる（四重極質量フィルタのデューティサイクルは100%で、飛行時間型分析器のデューティサイクルは5%であるが、実行するには2つの試行が必要であり、一方は高フラグメント化モードで衝突セルを動作させて行い、他方は低フラグメント化モードで衝突セルを動作させて行う。それ故、結果としてのデューティサイクルは5%から2.5%に半減する）。候補親イオンの完全な娘スペクトルを生成することにより特定の候補親イオンの同定を行う第2の工程は、5%のデューティサイクルで実行することができる（ここでも、四重極は約100%のデューティサイクルで質量フィルタとして動作し、飛行時間型分析器は約5%のデューティサイクルで分析器として働く）。したがって、多数の候補親イオンを発見し、候補親イオンの1つの娘イオンスペクトルを生成するのに必要な試行は3回のみであり、各試行のデューティサイクルは5%である。その結果、全体のデューティサイクルは5%/3=1.67%となる。

【0016】それ故、好ましい実施形態は、三連四重極の構成で実行される従来の方法の30倍優れたデューティサイクルを持っており、四重極飛行時間型質量分析計で実行される従来の方法に比べて300倍以上の改善を示す。そのような改善により、好ましい実施形態に従った装置および方法をオンラインクロマトグラフィのタイムスケールで有効に用いることができる。

【0017】フラグメント化手段が第1のモードで動作される場合には、イオンを通してフラグメント化を引き起こすフラグメント化手段に高い電圧が印加される。しかしながら、フラグメント化手段が第2のモードで動作される場合には、イオンのフラグメント化は実質的に少なく、そこを通過する分子イオンの割合が高い。

【0018】第1のモードでフラグメント化手段を動作させる工程は、以下から選択した電圧をフラグメント化手段に供給する工程を含むのが好ましい：(i) 15V以上、(ii) 20V以上、(iii) 25V以上、(iv) 30V以上、(v) 50V以上、(vi) 100V以上、(vii) 150V以上、(viii) 200V以上。第2のモードでフラグメント化手段を動作させる工程は、以下から選択した電圧をフラグメント化手段に供給する工程を含むのが好ましい：(i) 5V以

下、(ii) 4.5V以下、(iii) 4V以下、(iv) 3.5V以下、(v) 3V以下、(vi) 2.5V以下、(vii) 2V以下、(viii) 1.5V以下、(ix) 1V以下、(x) 0.5V以下、(xi) 実質的に0V。しかしながら、本発明の第1および第2の実施形態に対して好ましさの低い構成によると、第1のモードおよび/または第2のモードに、5Vから15Vの間の電圧を用いることもある。そのような状況下では、高エネルギーモードのイオンの一部が実際にはフラグメント化されず、同様に、低エネルギーモードのイオンの一部がフラグメント化されることが予想される。

【0019】イオンをフィルタリングするには、フラグメント化手段、例えば衝突セル、の上流にある第1の質量フィルタは、ある質量/電荷比（以下では「 $m/z$ 」）よりも大きい $m/z$ を持つイオンだけが通過するように構成されるのが好ましい。すなわち、好ましい実施形態によると、第1の質量フィルタは初めに、ハイパスフィルタとして動作するよう設定される。カットオフ点は、モニタリングされている固有の娘イオンの $m/z$ 値よりもやや高くなるように設定することができる。例えば、固有の娘イオンの $m/z$ 値が300であることがわかっている場合には、約350以上の $m/z$ 値を持つイオンのみが通過するように第1の質量フィルタを設定することができる。それ故、300の $m/z$ 値を持つイオンが質量分析器によって発見された場合、この $m/z$ 値を持つ親イオンは第1の質量フィルタによって取り除かれるため、そのイオンはフラグメント化手段内での親イオンのフラグメント化により引き起こされた娘イオンであるということになる。

【0020】第1の範囲は可変であることが好ましい。それ故、第1の質量フィルタによって通過するイオンの範囲は、必要に応じて走査ごとに変えることができる。

【0021】第1のモードで動作するフラグメント化手段を通り抜けたイオンの少なくとも一部を質量分析する工程は、第1の質量スペクトルを取得する工程を含み、第2のモードで動作するフラグメント化手段を通り抜けたイオンの少なくとも一部を質量分析する工程は、第2の質量スペクトルを取得する工程を含むことが好ましい。

【0022】第2のモードで動作するフラグメント化手段を通り抜けたイオンの少なくとも一部を質量分析する工程の後、少なくとも1つの候補親イオンを同定する工程を更に含むことが好ましい。第1の質量スペクトル内のある質量/電荷比を持つイオンの強度と第2の質量スペクトル内の同じ質量/電荷比を持つイオンの強度を比較することにより、少なくとも1つの候補親イオンが同定されることが好ましい。高い強度ピークが低エネルギーのスペクトルで見られ、高エネルギーのスペクトルで見られない場合には、そのピークが候補親イオンを示している可能性がある。

【0023】その方法は更に以下の工程を含むのが好ましい：少なくとも1つの候補親イオンを含む第2の範囲内の質量／電荷比を持つイオンが実質的にフラグメント化手段に到達するように構成され、第2の範囲外の質量／電荷比を持つイオンの通過が実質的に減らされるように、フラグメント化手段の上流においてイオンをフィルタリングする工程；第2のモードよりも実質的に多くのイオンがフラグメント化されるように、フラグメント化手段を動作させる工程；フラグメント化手段を通り抜けたイオンの少なくとも一部を質量分析する工程。換言すれば、候補親イオンが同定されたら、第1の質量フィルタは、基本的にその候補親イオンの $m/z$ 値を持つイオンの通過のみを許容する狭帯域フィルタとして動作するように設定されることが好ましい。好ましい実施形態によると、候補親イオンの質量／電荷比の $\pm x$ の質量／電荷比を持つイオンのみが実質的にフラグメント化手段

(4)に到達するように、第2の範囲が選択される。ここで、 $x$ は以下のグループから選択される：(i) 0.5、(ii) 1.0、(iii) 2.0、(iv) 5.0、(v) 10.0、(vi) 15.0、(vii) 20.0。したがって、質量分析計はタンデムMSモードで動作する。

【0024】イオン源は以下から選択することが好ましい：(i) エレクトロスプレイイオン源、(ii) 大気圧化学イオン化によるイオン源、(iii) マトリクス支援レーザー脱離イオン源。そのようなイオン源、特に前者2つには、液体クロマトグラフィによって混合物から分離された溶離物を、ある時間に渡って供給することができる。

【0025】イオン源は以下から選択することが好ましい：(i) 電気衝撃イオン源、(ii) 化学イオン化によるイオン源、(iii) フィールドイオン化によるイオン源。そのようなイオン源には、ガスクロマトグラフィによって混合物から分離された溶離物を、ある時間に渡って供給することができる。

【0026】質量分析工程は、以下から選択した分析器によって実行することが好ましい：(i) 四重極質量フィルタ、(ii) 飛行時間型質量分析器、(iii) イオントラップ、(iv) 磁場型質量分析器、(v) フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (FTICR) 質量分析器。特に、飛行時間型質量分析器が好ましい。

【0027】フィルタリング工程は、多要素イオン光学レンズ、好ましくは四重極ロッドセットによって実行されるのが好ましく、更に高周波および直流電界を印加することが好ましい。

【0028】多要素イオン光学レンズは、実質的に第1の値よりも大きい質量／電荷比を持つイオンのみが通過するように構成されることが好ましい。第1の値は以下から選択することが更に好ましい：(i) 100、(ii) 150、(iii) 200、(iv) 250、

(v) 300、(vi) 350、(vii) 400、(viii) 450、(ix) 500。好ましい実施形態で娘イオンを同定する工程は、第1の値よりも小さい質量／電荷比を持つことが決定された少なくともいくつかのイオンを同定する工程を含む。

【0029】フラグメント化手段は、以下から選択された衝突セルを備えることが好ましい：(i) 四重極ロッドセット、(ii) 六重極ロッドセット、(iii) 八重極ロッドセット、(iv) 電極リングセット。衝突セルは、高周波のみのモードで動作させ、好ましい構成において、 $10^{-4}$  から  $10^{-1}$  mbar の範囲、好ましくは  $10^{-3}$  から  $10^{-2}$  mbar の範囲内の圧力で衝突ガスが供給されることが更に好ましい。衝突セルは、十分に気密性の隔壁を形成することが更に好ましい。衝突ガスは、ヘリウム、アルゴン、窒素、空気もしくはメタンを含むことが好ましい。

【0030】所定の娘イオンは、以下から選択されたイオンを含むことが好ましい：(i) ペプチド由来のインモニウムイオン、(ii) 例えばリン酸化ペプチド由来のリン酸基  $PO_3^-$  イオンを含む官能基、(iii) 特定の分子もしくは特定の種類の分子から分離し、続いて同定されることによりその分子もしくはその種類の分子の存在を示す質量タグ。

【0031】好ましい実施形態によると、複数の固有の娘イオンに対して高衝突エネルギーMSスペクトル（すなわち、娘イオンスペクトル）を調べることにより候補親イオンを探すことができる。親イオンが特定の質量タグで「標識を付されている」場合には、これが特に当てはまる。2種類以上の親イオンが混合している場合には、それぞれ異なる質量タグで標識をつけることができ、2種類以上の固有の娘イオンを同時にモニタリングすることにより親イオンを発見することができる。それ故、2以上の異なる種類の化合物由来の親イオンを、一連の同じ試験で発見することができる。

【0032】本発明の第2の態様によると、請求項25記載の質量分析方法が提供される。

【0033】本発明の第3の態様によると、請求項26記載の質量分析計が提供される。制御システム、好ましくは自動制御システム、による様々な工程の実行は、好ましい特徴にすぎない。好ましさの低い実施形態では、方法の工程のいくつかがオペレータによる人為的な操作を含んでいてもよい。

【0034】本発明の第4の態様によると、請求項31記載の質量分析計が提供される。

【0035】本発明の第5の態様によると、請求項1～25のいずれかの方法を実行するように構成および適合された装置が提供される。好ましさの低い実施形態では、方法の工程のいくつかがオペレータによる人為的な操作を含んでいてもよい。

【0036】本発明の第2の実施形態と第6の態様によ

ると、請求項33記載の質量分析方法が提供される。

【0037】第1の実施形態では、目的の娘イオンが同定された時にのみ、フラグメント化手段が第2のモード（フラグメント化の程度が低い）で動作されるのに対して、第2の実施形態によると、フラグメント化手段は、高低のエネルギーモードの間で切り換わることが好ましい。すなわち、例えば所定の娘イオンが存在することが最初に決定されていてもされていなくても（すなわち、これとは関係なく）、親イオンのスペクトルを取得することができる。

【0038】3つの異なる動作モード（すなわち下位の実施形態）については、第2の実施形態で考慮されている。第1の動作モードでは、所定の娘イオンが娘イオンスペクトルに存在するか否かを決定するだけでよい。このモードでは、候補親イオンがはじめに同定されていることが好ましいものの、厳密には同定されている必要はない。第2の動作モードでは、少なくとも1つの娘イオンと少なくとも1つの候補親イオンの間にいくらかの関係性があるか否かが、（例えば官能基のような）所定のイオンの消失もしくは中性粒子の消失に基づいて決定される。また、第1の動作モードと第2の動作モード両方の決定工程を実行することができる第3の動作モードについても考慮されている。

【0039】更にその方法は、第1の範囲内の質量/電荷比を持つイオンが実質的に通過し、第1の範囲外の質量/電荷比を持つイオンの通過が実質的に減らされるように、フラグメント化手段の上流においてイオンをフィルタリングする工程を含むことが好ましい。

【0040】第1の範囲は可変であって、各走査で変更できることが好ましい。

【0041】少なくとも1つの娘イオンを同定する工程は、第1の範囲外の質量/電荷比を持つ少なくともいくつかのイオンを決定する工程を含むことが好ましい。第2の実施形態によると、第1の質量フィルタのカットオフ値よりも低い $m/z$ 値を持つ娘イオンに基づいて娘イオンを同定する工程が、娘イオンを同定する唯一の方法である。娘イオンを同定する他の方法についても考慮されている。

【0042】第1のモードで動作するフラグメント化手段を通り抜けたイオンの少なくとも一部を質量分析する工程は、第1の質量スペクトルを取得する工程を含み、第2のモードで動作するフラグメント化手段を通り抜けたイオンの少なくとも一部を質量分析する工程は、第2の質量スペクトルを取得する工程を含むことが好ましい。

【0043】第1の（娘イオンの）質量スペクトル内のある質量/電荷比を持つイオンの強度と第2の（親イオンの）質量スペクトル内の同じ質量/電荷比を持つイオンの強度を比較することにより、少なくとも1つの候補親イオンが同定されることが好ましい。第1の質量スペ

クトル内のある質量/電荷比を持つイオンの強度と第2の質量スペクトル内の同じ質量/電荷比を持つイオンの強度を比較することにより、少なくとも1つの娘イオンが同定されることが好ましい。候補親イオンは、前記第1のスペクトルに比べて前記第2の質量スペクトル内ではるかに高い強度を持つことが好ましい（娘イオンに対してはその逆である）。

【0044】(i) 少なくとも1つの娘イオンが所定の娘イオンと一致する、および/または、(ii) 少なくとも1つの娘イオンと少なくとも1つの候補親イオンが所定のイオンもしくは中性粒子の消失により関連付けられる可能性がある、ことが決定された場合には、その方法は更に以下の工程を含むことが好ましい：少なくとも1つの候補親イオンを含む第2の範囲内の質量/電荷比を持つイオンが実質的にフラグメント化手段に到達するように構成され、第2の範囲外の質量/電荷比を持つイオンの通過が実質的に減らされるように、フラグメント化手段の上流においてイオンをフィルタリングする工程；第2のモードよりも実質的に多くのイオンがフラグメント化されるように、フラグメント化手段を動作させる工程；フラグメント化手段を通り抜けたイオンの少なくとも一部を質量分析する工程。換言すると、目的の娘イオン、もしくは親イオンと娘イオン間の関係性もしくは関連性が確立されると、質量分析計はタンデムMSモードで動作するように切り換わる。

【0045】候補親イオンの質量/電荷比の $\pm x$ の質量/電荷比を持つイオンのみが実質的にフラグメント化手段に到達するように、第2の範囲が選択されることが好ましい。ここで、 $x$ は以下から選択される：(i) 0.5、(ii) 1.0、(iii) 2.0、(iv) 5.0、(v) 10.0、(vi) 15.0、(vii) 20.0。したがって、衝突セルの上流にある質量フィルタは、狭帯域フィルタとして動作することが好ましい。

【0046】イオン源は以下から選択することが好ましい：(i) エレクトロスプレーイオン源、(ii) 大気圧化学イオン化によるイオン源、(iii) マトリクス支援レーザー脱離イオン源。そのようなイオン源、特に前者2つには、液体クロマトグラフィによって混合物から分離された溶離物を、ある時間に渡って供給することが好ましい。

【0047】イオン源は以下から選択することが好ましい：(i) 電気衝撃イオン源、(ii) 化学イオン化によるイオン源、(iii) フィールドイオン化によるイオン源。そのようなイオン源には、ガスクロマトグラフィによって混合物から分離された溶離物を、ある時間に渡って供給することが好ましい。

【0048】質量分析工程は、以下から選択した分析器によって実行することが好ましい：(i) 四重極ロッドセット、(ii) 飛行時間型質量分析器、(iii) イオントラップ、(iv) 磁場型質量分析器、(v) フー

リエ変換イオンサイクロトロン共鳴（「FTICR」）質量分析器。特に、飛行時間型質量分析器が好ましい。

【0049】フィルタリング工程は、多要素イオン光学レンズ、好ましくは四重極質量フィルタによって実行されることが好ましい。高周波電界と直流電界の両方を多要素イオン光学レンズに印加することが、更に好ましい。

【0050】多要素イオン光学レンズは、実質的に第1の値よりも大きい質量／電荷比を持つイオンのみが通過するように構成されることが好ましい。第1の値は以下から選択することが更に好ましい：(i) 100、(ii) 150、(iii) 200、(iv) 250、(v) 300、(vi) 350、(vii) 400、(viii) 450、(ix) 500。娘イオンを同定する工程は、第1の値よりも小さい質量／電荷比を持つことが決定された少なくともいくつかのイオンを同定する工程を含むことが好ましい。

【0051】フラグメント化手段は、以下から選択された衝突セルを備えることが好ましい：(i) 四重極ロッドセット、(ii) 六重極ロッドセット、(iii) 八重極ロッドセット、(iv) 電極リングセット。衝突セルは、高周波のみのモードで動作されることが好ましく、 $10^{-3}$  から  $10^{-1}$  mbar の範囲、好ましくは  $10^{-3}$  から  $10^{-2}$  mbar の範囲内の圧力で衝突ガスが供給されることが更に好ましい。衝突セルは、気密性の十分な囲壁を形成するのが好ましい。

【0052】所定の娘イオンは、以下から選択されたイオンを含むことが好ましい：(i) ペプチド由来のインモニウムイオン、(ii) リン酸化ペプチド由来のリン酸基  $\text{PO}_3^-$  イオンを含む官能基、(iii) 特定の分子もしくは特定の種類の分子から生成し、続いて同定されることによりその分子もしくはその種類の分子の存在を示す質量タグ。

【0053】第1のモードでフラグメント化手段を動作させる工程は、以下から選択した電圧をフラグメント化手段に供給する工程を含むことが好ましい：(i) 15 V 以上、(ii) 20 V 以上、(iii) 25 V 以上、(iv) 30 V 以上、(v) 50 V 以上、(vi) 100 V 以上、(vii) 150 V 以上、(viii) 200 V 以上。

【0054】第2のモードでフラグメント化手段を動作させる工程は、以下から選択した電圧をフラグメント化手段に供給する工程を含むことが好ましい：(i) 5 V 以下、(ii) 4.5 V 以下、(iii) 4 V 以下、(iv) 3.5 V 以下、(v) 3 V 以下、(vi) 2.5 V 以下、(vii) 2 V 以下、(viii) 1.5 V 以下、(ix) 1 V 以下、(x) 0.5 V 以下、(xi) 実質的に 0 V。

【0055】本発明の第7の態様によると、請求項59記載の質量分析方法が提供される。

【0056】本発明の第8の態様によると、請求項60記載の質量分析計が提供される。

【0057】本発明の第9の態様によると、請求項66記載の質量分析計が提供される。

【0058】本発明の第10の態様によると、請求項33～59のいずれかの方法を実行するように構成および適合された装置が提供される。

【0059】四重極質量フィルタがはじめにハイパス特性を持つことは第1の実施形態においては好ましい（第2の実施形態においては任意）のだが、好ましさの低い実施形態においては、質量フィルタは帯域通過特性を持っていてもよい。質量フィルタが、「V字形の」通過率プロファイル、すなわち、高低の質量／電荷比で高い通過率を持ち、中央の両側において好ましい線形もしくは急激に増減する通過率を持つことがあることに関しても、好ましさの低い実施形態で考慮されている。

【0060】第1および第2の実施形両方で高低の衝突エネルギーを切り換える手段により、高衝突エネルギー「MSサーベイ」スペクトル内での特定の娘イオンの  $m/z$  値（名目値もしくは正確な値）の出現に基づいて、（候補）親イオンを選択することができる。第2の実施形態によると、選択基準は、高低の衝突エネルギー「MSサーベイ」スペクトル内のイオン間で  $m/z$  値（名目値もしくは正確な値）に一定の差を有するイオンの出現に基づいて選択することを含む。

【0061】1つ以上の親イオンが発見されると、両方の実施形態に従って、候補親イオンを更に選択および／または排除するため、すなわち可能性のある候補親イオンのリストを精選して候補親イオンを更に限定する最終候補リストを作成するために、多くの更なる基準を用いることができる。これらの基準は以下のものを含む：

- (a) 必要な電荷状態（通例、ペプチドは  $Z \geq 1$ 、薬物代謝物質は  $Z = 1$ ）に基づく選択。
- (b) 相対強度もしくは絶対強度に基づく選択。
- (c) 好ましい  $m/z$  の範囲内に包含されていることに基づく選択。
- (d) 好ましい  $m/z$  値（名目値もしくは正確な値）のリストに基づく選択。
- (e) 除外された  $m/z$  値（名目値もしくは正確な値）のリストに基づく排除（通例は、既知のバックグラウンドイオンやマトリクス関連の不純物）。
- (f) 除外された  $m/z$  値の一時的な（動的な）リストに基づく排除（通例は重複を防ぐために最近分析された前駆イオン）。

【0062】第2の実施形態と、第1の実施形態の好ましさの低い特徴によると、多電荷親イオンのフラグメント化によって形成された娘イオンは、候補親イオンの質量／電荷比よりも高い質量／電荷比を持つイオンの存在により検出することができる。この工程は、親イオンがエレクトロスプレーによって生成された場合に、特に適

切である。

【0063】第1および第2の実施形態によると、多数の成分が共に溶離する場合に、第1の質量フィルタMS1を用いて真の前駆イオンを発見し、それぞれの候補前駆イオンを選択し、次いでMS/MSフラグメントスペクトルを記録することができる。しかしながら、取得されるスペクトルの数は、候補前駆イオンの数と等しい数しか増加しないだろう。これでは依然として、従来の親イオン走査法に必要な非常に多数のスペクトルよりもはるかに少ない。

【0064】多数の成分が共に溶離する場合には、追加のフィルタリング基準を用いることにより候補前駆イオンの数を減らす余地がある。例えば、低衝突エネルギースペクトルで観察された各候補前駆イオンに対応する1つ以上の固有の中性消失イオンの存在に対して、高衝突エネルギースペクトルも調べれば、目的の前駆イオンを発見することができる。これで、記録するMS/MSフラグメントスペクトルの数を減らすことができ、多くの場合1つのスペクトルで済む。

【0065】原則的に、候補前駆イオンの数が4以上の場合には、取得されるMS/MSスペクトルの数は、質量に従って2等分もしくはほぼ等分の下位グループに候補前駆物質を繰り返し下位区分することにより、更に減少できる。次いで、2つのグループを分割する $m/z$ 値にMS1の低質量のカットオフ値を設定することにより、各下位グループ内のすべての前駆イオンに対する高衝突エネルギースペクトルが記録される。排除の工程により、この手順を踏んで、より少ない段階で目的の前駆イオンに到達することができる。実際的には、このアプローチは、候補前駆イオンの数が6以上の際に好ましい。それでも、この方法の潜在的な価値を示すと、16成分の混合物では目的の前駆イオンを発見するのに16のMS/MSスペクトルが必要なのに対し、このアプローチによると、必要なMS/MSスペクトルの数を5つに減らすことができる。

【0066】特定の生成イオンの $m/z$ 値の存在に基づく前駆イオンの発見に必要なのは、高エネルギーCID（衝突誘導解離）「MSサーベイ」スペクトルのみを最初に調べることである。適切な場合には、特定の生成イオンの $m/z$ 値を通過させないように四重極質量フィルタの $m/z$ 通過範囲を設定し、その $m/z$ 値のイオン源からすべてのバックグラウンドイオンを除去することができる。特定の $m/z$ 値のイオンすべてを生成イオンのみにすることができる。目的の娘イオンが溶離する際に、低エネルギーCID「MSサーベイ」スペクトルによって、（候補）親イオンの最終候補リストが作られる。電荷状態、除外された $m/z$ 値などの様々な選択および/または排除基準によって、更にこのリストを任意にフィルタリングすなわち精選することができる。目的の前駆イオンの確認と同一に必要なのは、（任意に更なるフ

ィルタリングをなされた）最終候補リストのためのMS-MSスペクトルの取得のみである。これによって、第1の質量フィルタMS1を走査することなしに、従来の親イオン走査法と同様の目的が達成され、しかも、目的の前駆イオンの完全な娘イオンスペクトルを取得するというボーナスまでついてくる。正確な生成イオンの $m/z$ 値を特定することにより、更に選択性が高まる。

【0067】特定のニュートラルロスまたはイオン消失の存在に基づく前駆イオンの発見に必要なのは、高低のエネルギーCID「MSサーベイ」スペクトル両方を調べることである。低エネルギースペクトルにより、候補前駆イオンの最終候補リストが作られる。再び、電荷状態、除外された $m/z$ 値などの様々な基準によって、更にこの最終候補リストをフィルタリングすることができる。これで、特定のニュートラルロスすなわちイオン消失に関する $m/z$ 値の最終候補リストを作成することができる。ここで、これらの $m/z$ 値は、高エネルギーCID「MSサーベイ」スペクトルで探される。すべての衝突に対する前駆イオンを、そのMS-MSスペクトルを取得することにより確認および同定することができる。これによって、MS1およびMS2を走査することなしに、従来のニュートラルロス走査法と同様の目的が達成され、しかも、目的の前駆イオンの完全な生成イオンスペクトルを取得するというボーナスまでついてくる。ここでも、正確な $m/z$ 値を特定することができる。

【0068】様々な好ましい実施形態により、親イオン走査の従来技術を超える数々の利点を提供される。その利点には、親イオンの質量/電荷比を発見する可能性や、それらの親イオンに関係する娘イオンのスペクトルを例えばクロマトグラフィタイムスケールなどのオンラインタイムスケール内で取得することが含まれる。また、好ましい実施形態は、従来の親イオン走査法よりも高い感度を有し、親イオンの $m/z$ 値選択のための1回の試験に多数の基準を組み入れる可能性を開くものである。また、多数の種類の親イオンを1回の試験で発見することも可能であり、その方法は質量タグ法と一緒に用いることができる。

【0069】

【発明の実施の形態】ここで、図1を参照して好ましい実施形態を説明する。質量分析計6は、イオン源1（エレクトロスプレーイオン源が好ましい）と、イオンガイド2と、第1の四重極質量フィルタ3と、衝突セル4と、リフレクトロンを組み込んだ直交加速型飛行時間分析器5とを備えている。質量分析計6は、液体クロマトグラフ（示されていない）などのクロマトグラフに接続されていてもよい。そうすれば、イオン源1に入れるサンプルを液体クロマトグラフの溶離物から得ることができる。

【0070】脱気されて、例えば $10^{-5}$  mbar未満の比較的低圧力に維持されたチャンバ内に、四重極質量フ

フィルタ 3 が配置されている。質量フィルタ 3 を含む電極は、フィルタ 3 を通過する質量／電荷比の範囲を決定する RF および DC 電圧両方を発生させる電源に接続されている。フラグメント化手段 4 は、衝突セルが好ましく、質量フィルタ 3 を通過するイオンを受け取るように配置される。特に好ましい実施形態では、衝突セルは、四重極もしくは六重極ロッドセットを備えてもよく、ロッドセットは気密性の十分なケーシングで囲み、ケーシング内にヘリウム、アルゴン、窒素、空気、メタンなどの使用中の衝突ガスを、 $10^{-4}$  から  $10^{-1}$  mbar、更に好ましくは  $10^{-3}$  から  $10^{-2}$  mbar で導入することができる。フラグメント化手段 4 を含む電極に適当な高周波電圧は、電源（図示せず）によって供給される。

【0071】イオン源 1 によって生成されたイオンは、イオンガイド 2 を通り抜け、質量フィルタ 3 とフラグメント化手段 4 に進入する。フラグメント化手段 4 から出たイオンは、飛行時間型質量分析器 5 に進入する。装置の様々な部品間のイオンの伝送を最大化するために、イオンガイドや静電レンズなどの他のイオン光学構成要素を備えてもよいが、図には示されておらず、説明も省略している。様々な真空ポンプ（図示せず）が、装置内の光学的な真空状態を保つために設けられていてもよい。飛行時間型質量分析器 5 は、イオンの質量／電荷比を決定できるように、イオンのパケット内に含まれるイオンの伝送時間計測による既知の方法で動作する。

【0072】制御手段（図示せず）は、それぞれイオン源 1、イオンガイド 2、四重極質量フィルタ 3、フラグメント化手段 4、飛行時間型質量分析器 5 に必要な動作電圧を供給する様々な電源（図示せず）に対する制御信号を発信する。これらの制御信号は、例えば質量フィルタ 3 を通過する質量／電荷比や分析器 5 の動作など、装置の動作パラメータを決定する。通例、制御手段は、取得される質量スペクトルデータの処理にも用いられるコンピュータ（図示せず）からの信号によって制御される。また、コンピュータは、分析器 5 から生成される質量スペクトルを表示、記憶し、オペレータからの命令を受信、処理できる。制御手段は、オペレータの介入なく自動的に様々な方法を実行し、様々な決定をすることが可能であり、また、様々な段階で任意にオペレータの入力を要求することが可能である。

【0073】図 2 a および図 2 b はそれぞれ、アルコールデヒドロゲナーゼとして知られる ADH のトリプシン消化の娘イオンおよび親イオンスペクトルを示している。図 2 a に示されている娘イオンのスペクトルは、衝突セルの電圧（すなわちフラグメント化手段 4 に印加される電圧）が高い際に得られたものである。例えば、その電圧は 30 V であり、その結果、衝突セルを通るイオンに十分なフラグメント化が起こる。図 2 b に示されている親イオンのスペクトルは、例えば 5 V 以下の低い衝突エネルギーで得られたものである。この例の質量スペク

トルは、液体クロマトグラフから溶離したサンプルから得られたものであり、十分迅速に得られ、液体クロマトグラフから溶離した実質的に同一な要素に対応するものは互いに近かった。

【0074】本発明の両実施形態によると、目的となる所定の娘イオン、例えば図 2 a に示すように 136、1099 の  $m/z$  値を持つ娘イオンの存在を決定することができる。この決定は、コンピュータによる自動決定とオペレータのいずれかにより行うことができる。第 1 の実施形態によると、この決定がなされれば、衝突セルに印加される電圧が低く設定され、親イオンのスペクトル（図 2 b 参照）が取得される。

【0075】次いで、両実施形態で、親イオンのスペクトルを分析し、どのピークが候補親イオンに対応するかを決定することができる。図 2 b の親イオンのスペクトルで、例えば 418、7724 や 568、7813 のピークのように、いくつか強度の高いピークがあるのだが、それらのピークは対応する娘イオンのスペクトルには実質的に存在しない。したがって、これらのピークは、候補親イオンを示唆するものであると考えることが好ましい。

【0076】両実施形態によると、例えば 136、1099 の  $m/z$  値を持つ目的の所定娘イオンが発見され、例えば 418、7724 と 568、7813 の  $m/z$  値を持つ対応する候補親イオンが発見されると、質量フィルタ 3 は、狭帯域パスフィルタとして動作するよう設定され、実質的に候補親イオンのうち 1 つのみ、例えば 418、7224 の  $m/z$  値を持つイオンのみをフラグメント化手段 4 に伝送する。フラグメント化手段 4 は、その候補親イオンに対する完全な娘スペクトルが得られるように、高衝突エネルギーに設定される。目的の所定娘イオンが完全な娘スペクトル内に存在する場合には、それが、選択された候補親イオンの生成イオンに違いない。所定娘イオンが存在しない場合には、他の候補親イオンが選択される。

【0077】すべての候補親イオンのピークに対して娘イオン走査を行う必要がある場合でも、従来の親イオン操作方法よりも必要な走査ははるかに少ない。

【0078】特定のピークが有意であるか否かを決定する際に考慮することのできる変数は、例えば、得られたピークの強度やイオンの電荷状態（様々な既知の方法により推定できる）である。また、ある規準に基づくと、イオンを考慮しなくてもよい。

【0079】本発明の両実施形態に関して、娘イオンのスペクトルを複数の固有の娘イオンに対して調べることで候補親イオンを探すことは適切である。

【0080】本発明の第 2 の実施形態によると、候補親イオンは、娘イオンの組み合わせや親イオン由来の所定のイオンもしくは中性粒子の消失に基づいて探すことができる。親イオンが特定の質量タグで「標識を付されて

いる」場合には、これが特に当てはまる。2種類以上の親イオンが混合している場合には、それぞれ異なる質量タグで標識をつけることができ、2種類以上の固有の娘イオンを同時にモニタリングすることにより標識を発見することができる。それ故、2以上の異なる種類の化合物由来の親イオンを、一連の同じ試験で発見することができる。

【0081】第2の実施形態によると、異なる衝突電圧で連続的にスペクトルを取得することができる。特に好ましい構成は、比較的高い衝突電圧と低い衝突電圧で交互にスペクトルを取得する構成である。液体クロマトグラフィなどのオンライン処理の出力を分析するのにその方法を用いると、交互のスペクトルが、クロマトグラフから分離するサンプルの同一な組成に実質的に対応するため、特に有効である。

【0082】本発明の好ましい実施形態の様々な態様に更なる説明を加えるために、多くの実施例を提示する。

#### 【0083】実施例1—ニュートラルロス

利用できるゲノム配列の情報が著しく増加したことと、質量分析計の感度と選択性が増大したことにより、大型のタンパク質の同定が可能になった。しかしながら、同定されたタンパク質上に存在する翻訳後修飾 (post-translational modification) の分析は、更に困難な問題である。現在、質量分析計によって最も具体的な解決策を打ち出しているのは、前駆イオン走査法である。前駆イオン走査試験を実行すると、フラグメント化して共通の特徴的な生成イオンを生成するイオンすべてを、質量分析計が探索する。典型的な応用例は、タンパク質の消化混合物を走査し、リン酸化された可能性があるペプチドのみを探す工程である。第1の四重極質量フィルタ (MS1) と、四重極衝突セルと、直交型飛行時間質量分析器 (MS2) とを備えた既知の質量分析計 (マイクロマス社のQ-TOF2を利用できる) で前駆イオンの試験を行う現在の方法は、前駆イオンが見られる $m/z$ の範囲にわたって装置の四重極MS1を走査する工程と、飛行時間型分析器で完全な生成イオンスペクトルを記録する工程とを含む。しかしながら、このアプローチでは、走査する四重極のデューティサイクル (利用率) が比較的低いために、前駆イオン試験の感度が制限される可能性がある。

【0084】既知の質量分析計でHPLC試験が行われている間に、翻訳後に修飾された特定のペプチドの同定と配列決定を行うことができる試験方法を説明する。この試験では、四重極は広帯域モードで運転された。

【0085】サンプルは、マイクロマス社のモジュールであるCapLCシステムにより質量分析計に導入された。サンプルは、C18カートリッジ (0.3 mm x 5 mm) に載せられ、0.1%のHCOOHを用いて1分あたり30  $\mu$ Lの流量で3分間脱塩された (図3)。次いで、ペプチドが分離用の分析カラムに分離す

るように、10個のポートバルブが切り換えられた (図3挿入図参照)。ポンプAおよびBからの流れは、カラム内の流量を約200 nL/minにするために分流された。

【0086】用いた分析カラムは、ウォーターズ社シメトリC18 (www.waters.com) を入れたPicoFrit (商標) (www.newobjective.com) カラムである。これは、質量分析計に直接噴霧するように設定された。エレクトロスプレイ電圧 (約3 kV) が、死空間の少ないステンレス鋼ユニオンを経由して液体に印加された。少量 (約5 psi) の噴霧ガスが、エレクトロスプレイ処理を促進するためにノズルチップ周辺に導入された。

【0087】すべてのデータは、Z-スプレイ・ナノフロ・エレクトロスプレイイオン源を備えたQ-TOF2四重極直交加速型飛行時間ハイブリッド質量分析計 (www.micromass.co.uk) を用いて取得された。質量分析計は、イオン源温度80°C、コーンガス流量40 L/hrの正イオンモードで運転された。

【0088】その装置は、グルタミン酸フィブリノペプチドbの衝突誘導解離 (CID) から生じ、選択されたフラグメントイオンを用いて多点キャリブレーションでキャリブレートされた。すべてのデータは、マスリンクス社のソフトウェアを用いて処理された。

【0089】HPLC勾配中には、その装置はMSモードで運転され、衝突セルにアルゴンを入れた状態で、高低の衝突エネルギーの間を1秒間隔で交互に切り換えられた。四重極MS1は、質量の範囲全体を飛行時間型分析器に送ることのできる高周波のみのモードで運転された。低エネルギー (4 eV) での第1のデータセットは、普通の擬似分子イオンのみを示している。また、高エネルギーでの第2のデータセットは、それらの生成イオンも含んでいる (図4参照)。目的の生成イオンが高エネルギーのデータ内に存在した場合には必ず、その前駆物質である可能性のあるものすべてが、対応する低エネルギーデータ内に存在した。次いで、質量分析計は、MS/MSモードに切り換えられ、真の親を明らかにするために可能性のある前駆物質が選択された。

【0090】ホスホペプチドの場合には、ホスホセリンを含む前駆物質とホスホトレオニンを含む前駆物質は、高エネルギー条件下で98 Da (ダルトン) のニュートラルロス ( $H_3PO_4$ ) を示すため、両方とも同定することができる。それに対応して、ソフトウェアは、低エネルギースペクトル内で同定された前駆物質からニュートラルロスのリストを作成することができる。これは、前駆イオンの質量を計測し、それらの電荷状態を決定し、ニュートラルロスすなわち97.9769 (1+)、49.9885 (2+) を減じる工程を含む。高エネルギースペクトルでニュートラルロスが現れることにより、装置は生成イオンモードに切り換わり、ニュートラルロスを確

認し、更なる配列情報を取得する。Q-TOF 2の正確な質量性能により、特にリン酸塩で観察されるような質量欠損ロスの場合には、ニュートラルロスの特異性が増大する。図5は、正確なニュートラルロス試験の概要を示している。

【0091】図6は、カラムに入れられた100 fm (フェムトモル) のアルファカゼイン消化産物で行った正確なニュートラルロス試験の結果を示している。MS/MSクロマトグラムから見られるように、その装置は、試験中に2回生成イオンモードに切り換わり、830.02 (2+) と976.46 (2+) のイオンがニュートラルロスを示したことを示唆した。

【0092】図7は、976.46 (2+) イオン溶離時の高低エネルギーのスペクトルを示している。低エネルギースペクトルは、最低限である8つの多電荷イオンを含んでいる。高エネルギースペクトルは、8つのペプチドに由来するフラグメントイオンの複雑な混合物を示している。図8にはm/zが910~955までの拡大図が示されており、976.46 (2+) のペプチドが、フラグメント化し、±20 mDa (ミニダルトン) の正確なマズウィンドウ内にニュートラルロスとして特定されているイオンを生成したことがわかる。スペクトル内の他の生成イオンはすべて、ニュートラルロスとして特定される基準に合わなかった。

【0093】976.46 (2+) のイオンがニュートラルロスを受けたと記録すると、その装置はMS/MSモードに切り換わる。これにより、ニュートラルロスとして特定されたイオンが976.46 (2+) のイオンから生じ、イオン源に存在する他のペプチドの1つから生成した偶然一致のフラグメントイオンではないことが確認される(図9参照)。生成イオンのスペクトルは、リン酸化ペプチドからの配列情報も提供する。

【0094】図11は、カラムに注入され、10 fmの濃度で発見されたベータカゼイン消化ペプチド由来のH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>のニュートラルロスを示している。

【0095】ホスホチロシンの場合には、H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>のニュートラルロスを生じるフラグメント化は起こらない。しかしながら、分解して、ポジティブESIでm/z値216でリン酸化インモニウムイオンを生成する。ソフトウェアは、このイオンをモニタリングする命令を受け、そのイオンが高エネルギースペクトル内に現れた際にMS/MSモードに切り換えることができる。

【0096】実施例2—アミノ酸アスパラギンを含むペプチドの自動発見

HPLC分離とタンパク質ADH (アルコールデヒドロゲナーゼ) のトリプシン消化分析のための全イオンクロマトグラムが、図12に示されている。このクロマトグラムは、Q-TOFタンデムMS/MSシステムに記録されたすべての低エネルギースペクトルから抽出されたものである。このデータに対して、Q-TOFは、MSモ

ードで動作し、連続的なスペクトルに対してガス衝突セル内の高低の衝突エネルギー間を交互に入れ替わった。

【0097】図13は、図12に関して上述したように、同じHPLC分離と質量分析から抽出されたm/z値が87.04の質量クロマトグラムを示している。アミノ酸であるアスパラギンに対するインモニウムイオンは、87.04のm/z値を持っている。このクロマトグラムは、Q-TOFに記録されたすべての高エネルギースペクトルから抽出されたものである。

【0098】図14は、走査番号604に関連した完全な質量スペクトルを示している。これは、Q-TOFで記録された低エネルギー質量スペクトルであり、m/z値が84.04の質量スペクトル内で最大のピークに関連する走査605の高エネルギースペクトルに次ぐ低エネルギースペクトルである。これは、m/z値が87.04のアスパラギンインモニウムイオンの親イオンが1012.54の質量を持つことを示している。何故なら、m/z値が1013.54の1価のイオン(M+H)<sup>+</sup>とm/z値が507.27の2価のイオン(M+2H)<sup>++</sup>を示しているからである。

【0099】実施例3—ニュートラルロスによるタンパク質のリン酸化の自動発見

図15は、タンパク質βカゼインのトリプシン消化のQ-TOFタンデムMS/MSシステムで記録された低エネルギースペクトルからの質量スペクトルを示している。そのタンパク質の消化生成物は、HPLCで分離され、質量分析された。その質量スペクトルは、MSモードで動作し、連続的なスペクトルに対してガス衝突セル内の高低の衝突エネルギー間を交互に入れ替わるQ-TOFで記録された。

【0100】図16は、上述の図15と同じHPLC分離期間に記録された高エネルギースペクトルからの質量スペクトルを示している。

【0101】図17は、上述の図16と同じスペクトルの拡大図を示している。このスペクトルに対しては、ピークを確認し、ピーク領域に比例する高さを持つ線として表示するように連続データが処理され、重心質量に対応する質量が付記されている。m/z値が1031.4395のピークはペプチドの2価イオン(M+2H)<sup>++</sup>であり、m/z値が982.4515のピークは2価のフラグメントイオンである。それは、低エネルギースペクトル内に存在しないので、フラグメントイオンに違いない。これらのイオン間の質量の差は、48.9880である。H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>の理論的な質量は97.9769である。2価イオンH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub><sup>++</sup>のm/z値は48.9884であり、観察値とわずか8 ppm差である。

【0102】実施例4—固有のニュートラルロスの認識によるリン酸化ペプチドの親イオンの発見

衝突セルに衝突ガスが入れられ、交互の高低エネルギースペクトルを取得する取得装置を備えて、質量スペクトル

を取得するよう、Q-TOF 2 質量分析計が組み立てられた。H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> イオンの消失に関して候補親イオンと質量の差がある娘イオンが確認された場合、システムは、その候補親イオンの MS/MS スペクトルを取得するように自動的に切り換わる。

【0103】以下は、そのような取得の例である。タンパク質 α カゼインが消化され、100 fmol (フェムトモル) の消化物が、Q-TOF 2 のエレクトロスプレーイオン源への噴霧の前に液体クロマトグラフィで分離するために注入された。

【0104】図 18 の 3 つの図は、以下のクロマトグラムを示している：(1) 低エネルギー MS モードでの TIC (全イオンカレント) クロマトグラム、(2) 高エネルギー MS モードでの TIC クロマトグラム、(3) MS/MS モードでの TIC クロマトグラム。

【0105】20.9 分と、23.5 分と、25.5 分において溶離したクロマトグラムのピークは、トレース (1) および (2) に示されているクロマトグラムでは切断されている。何故なら、これらの 3 つのピークに対しては、システムがピークの溶離の途中で MS/MS モードに切り換わったからである。これは、MS/MS スペクトルが取得された時間を示すトレース (3) に示唆されている。

【0106】図 19 の 3 つの図は、以下の質量スペクトルを示している：(1) 実行後 25.335 分での低エネルギー質量スペクトル、(2) 実行後 25.315 分での高エネルギー質量スペクトル、(3) 実行後 25.478 分での m/z 範囲 976 ~ 978 の間の完全な MS/MS スペクトル。

【0107】トレース (1) のスペクトルは、25.335 分での低エネルギー質量スペクトルを示している。それは主に、1952 ダルトンの質量を持つペプチドの 2 価イオン (m/z 値 976.4) と 3 価イオン (m/z 値 651.6) を示している。トレース (2) のスペクトルは、25.315 分での高エネルギー質量スペクトルを示しており、m/z 値が 927 での新しいピーク (標識されていない) を示している。これは、低エネルギースペクトルに存在しないので、娘イオンに間違いなく、m/z 値が 976 の親イオンと m/z 値で 49 の差がある。この質量は、2 価イオン H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> の質量に関するものである。システムは、この質量の差を自動的に認識し、m/z 範囲 976 ~ 978 からの MS/MS スペクトルを記録するよう切り換わった。MS/MS スペクトルは、2 価イオン H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> の消失に関する m/z 値 927 のピークが m/z 値 976 の親イオンに由来することを立証するものである。その親イオン由来の他のフラグメントイオンも示しているの、ペプチドの同定を確認することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】好ましい構成の概略図。

【図 2 a】典型的な娘イオンスペクトルを示す図。

【図 2 b】典型的な親イオンスペクトルを示す図。

【図 3】サンプルの積込みおよび脱塩の際にバルブを切り換える装置の概略図であり、差し込み図は、分析カラムからのサンプルの脱離を示す。

【図 4】好ましくは 1 秒間隔での、衝突セル内にアルゴンガスを入れた状態での高低の衝突エネルギー間での Q-TOF 2 質量分析計の切り換えを示し、低エネルギーのデータセットは擬似分子イオンを示し、高エネルギーのデータセットはそれらのフラグメントイオンを示す図。

【図 5】正確なニュートラルロス試験のフローチャートを示す図。

【図 6】カラムに載せられた 100 fmol のアルファカゼイン消化産物で行った正確なニュートラルロス試験の結果を示す図。

【図 7】図 6 に示されている 976.46 (2+) イオン溶離時の高低エネルギーのスペクトルを示す図。

【図 8】m/z 値 910 ~ 995 間の高低エネルギースペクトルの拡大図。

【図 9】生成イオンモードでの 976.46 (2+) からのニュートラルロスの確認を示す図。

【図 10】976.46 (2+) の注釈された生成イオンスペクトルを示す図。

【図 11】カラムに注入された 10 fmol のベータカゼイン消化ペプチド由来の H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> のニュートラルロスを示す図。

【図 12】ADH トリプシン消化物の全イオンクロマトグラムを示す図。

【図 13】87.04 (アスパラギンインモニウムイオン) の質量クロマトグラムを示す図。

【図 14】ADH 配列 ANELLINVK MW 1012.59 由来のフラグメント T5 を示す図。

【図 15】β カゼインのトリプシン消化の低エネルギースペクトルに対する質量スペクトルを示す図。

【図 16】β カゼインのトリプシン消化の高エネルギースペクトルに対する質量スペクトルを示す図。

【図 17】図 16 と同じスペクトルの拡大図。

【図 18】α カゼインのクロマトグラムを示す図。

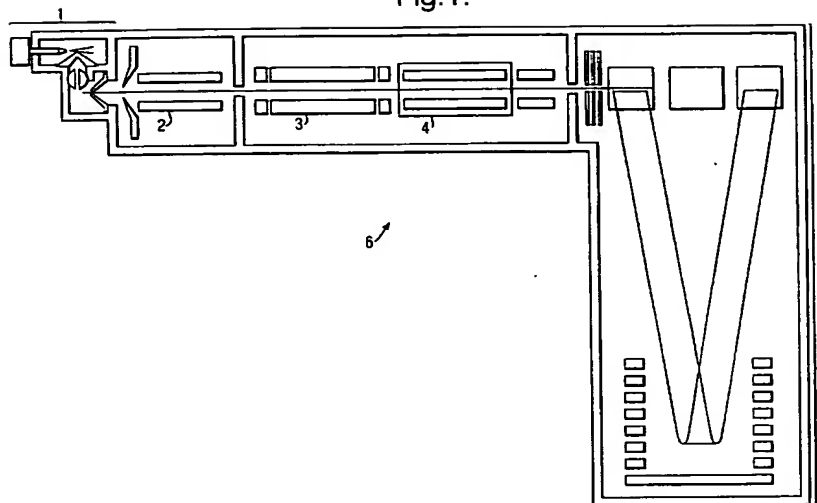
【図 19】α カゼインの質量スペクトルを示す図。

【符号の説明】

- 1 イオン源
- 2 イオンガイド
- 3 第 1 の四重極質量フィルタ
- 4 衝突セル
- 5 リフレクトロンを組み込んだ直交加速型飛行時間分析器
- 6 質量分析計

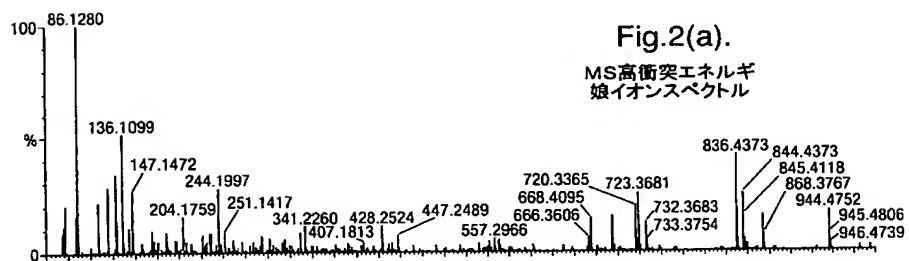
【図 1】

Fig.1.



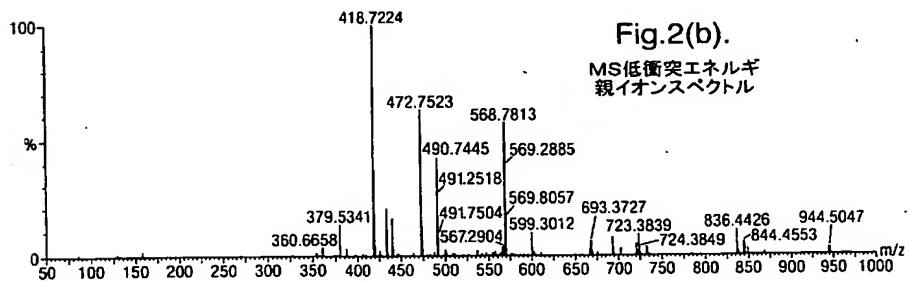
【図 2 a】

Fig.2(a).

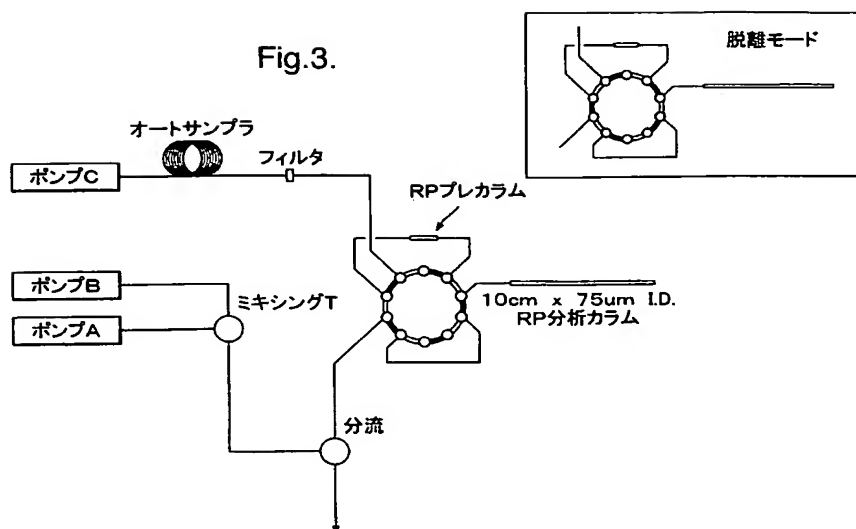
MS高衝突エネルギー  
娘イオンスペクトル

【図 2 b】

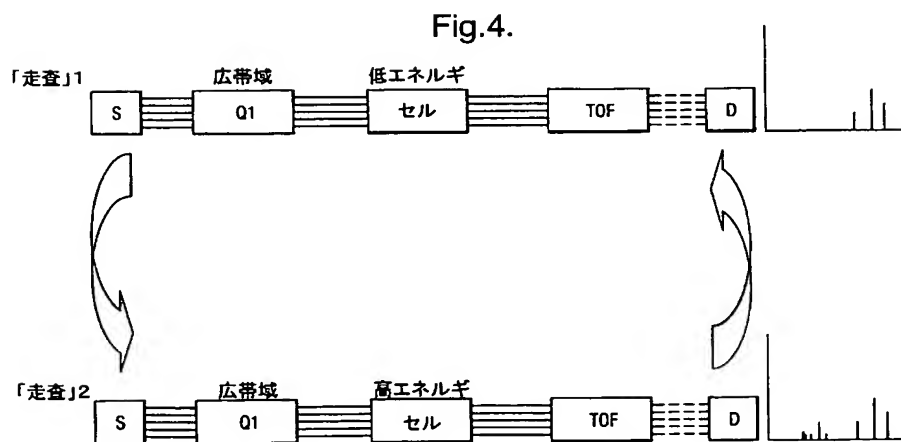
Fig.2(b).

MS低衝突エネルギー  
親イオンスペクトル

【図3】

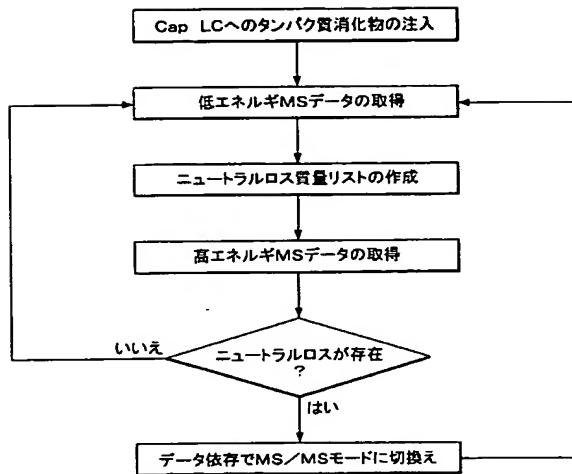


【図4】



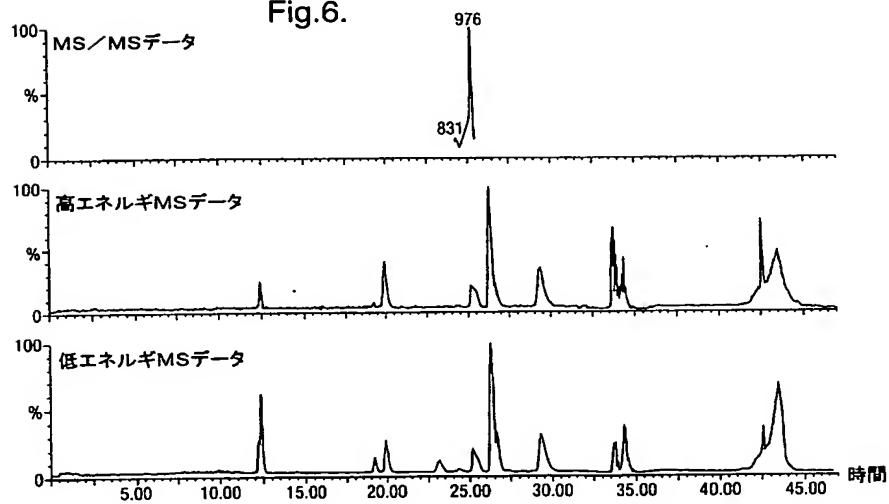
【図5】

Fig.5.

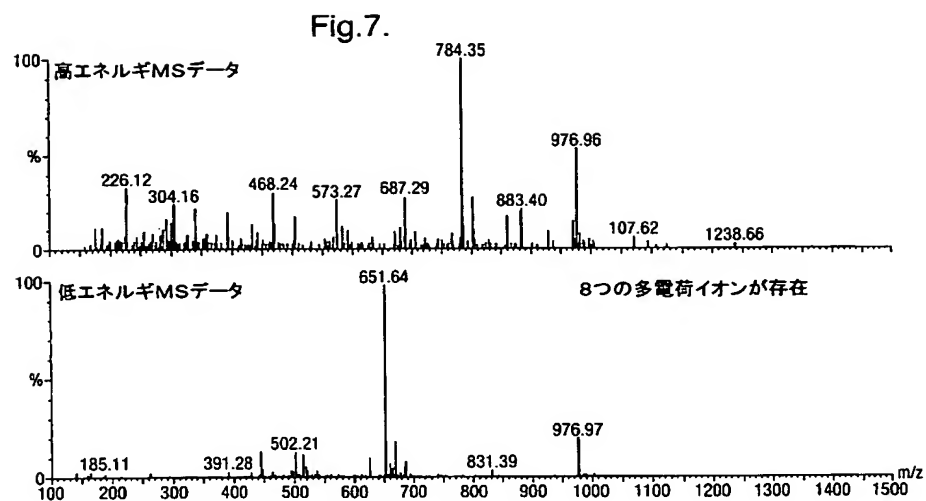


【図6】

Fig.6.

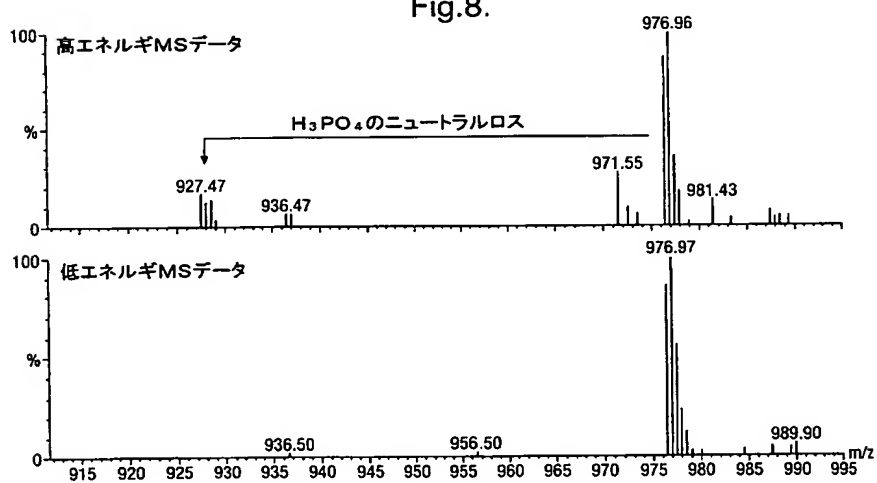


【図7】

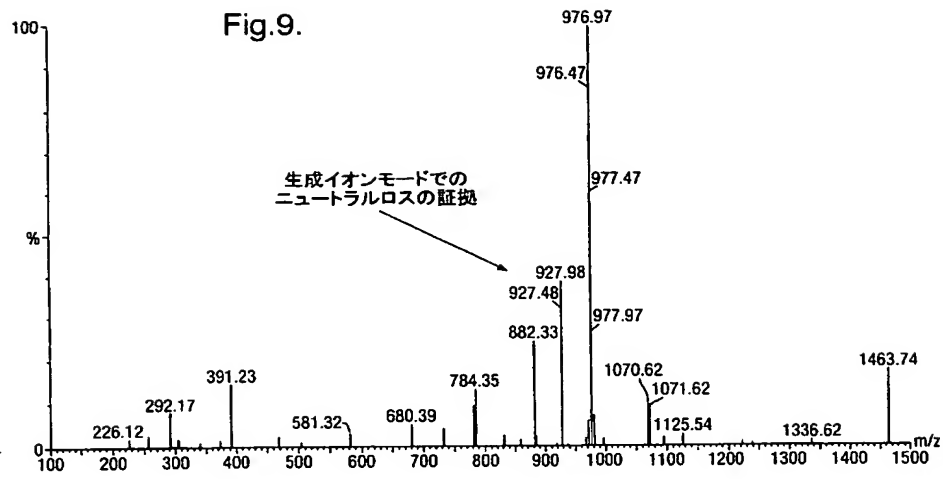


【図8】

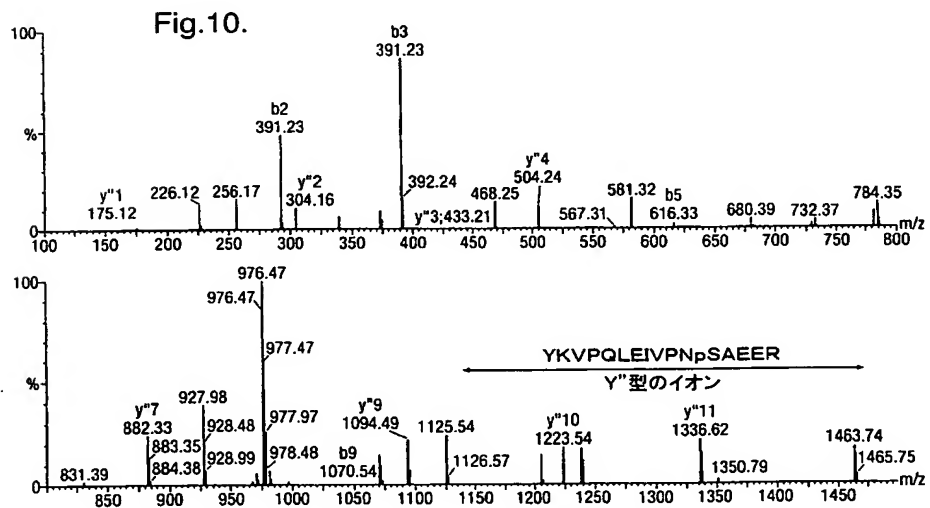
Fig.8.



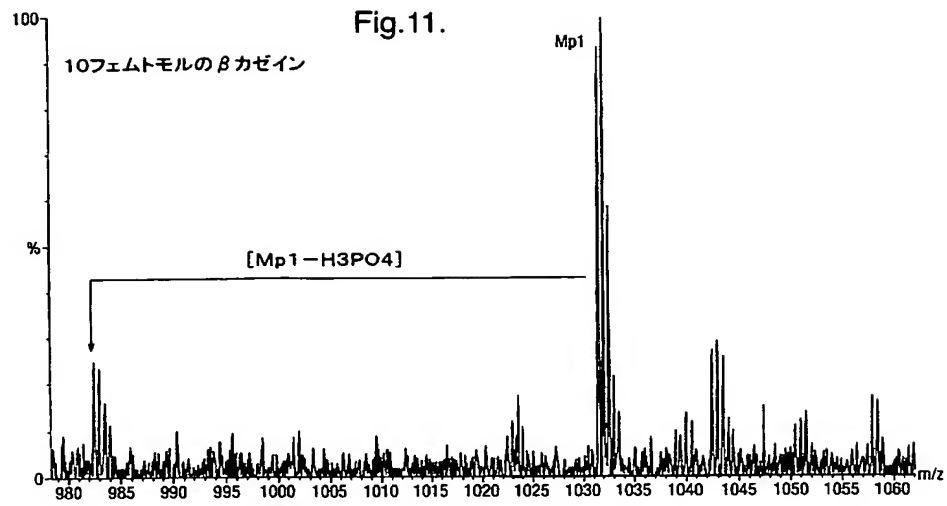
【図 9】



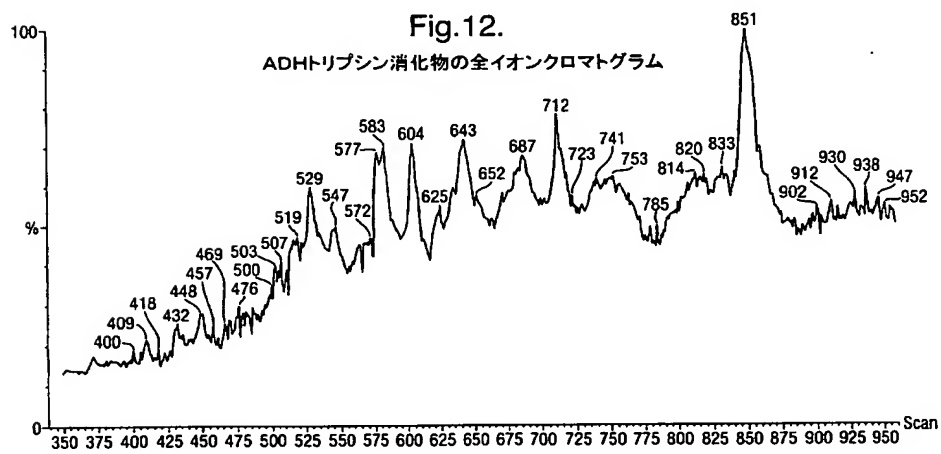
【図 10】



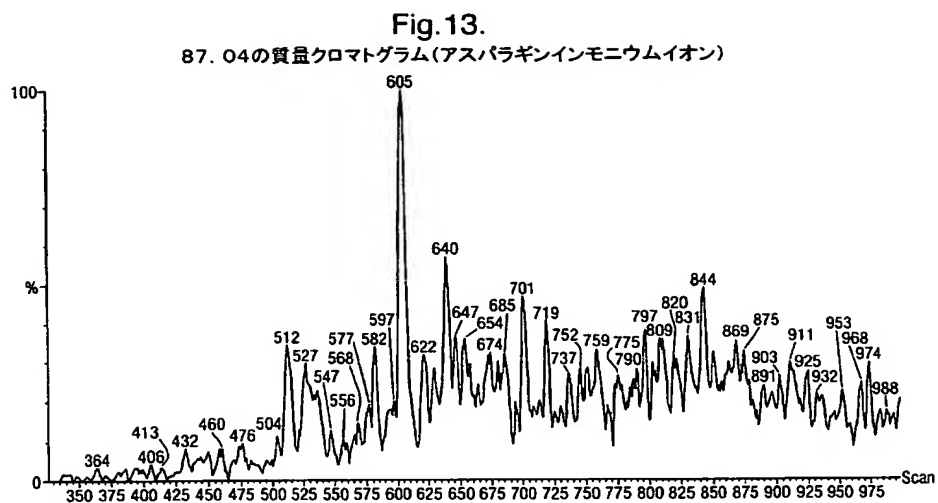
【図11】



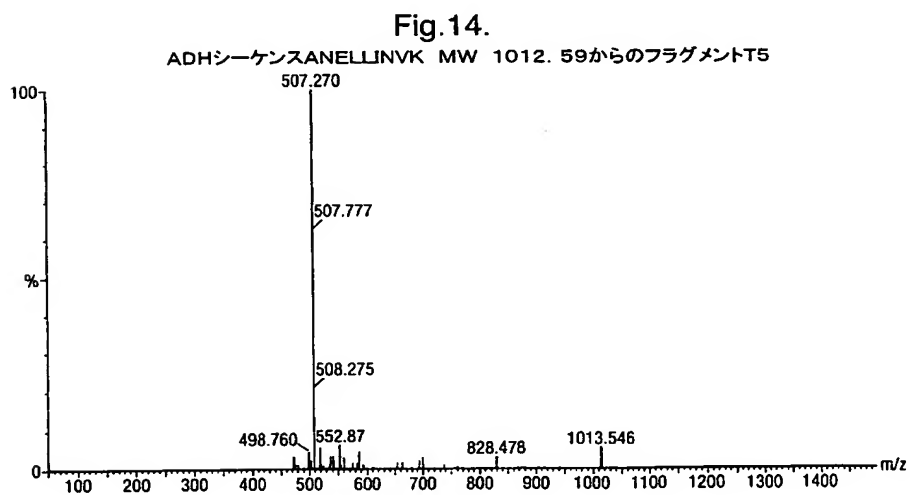
【図12】



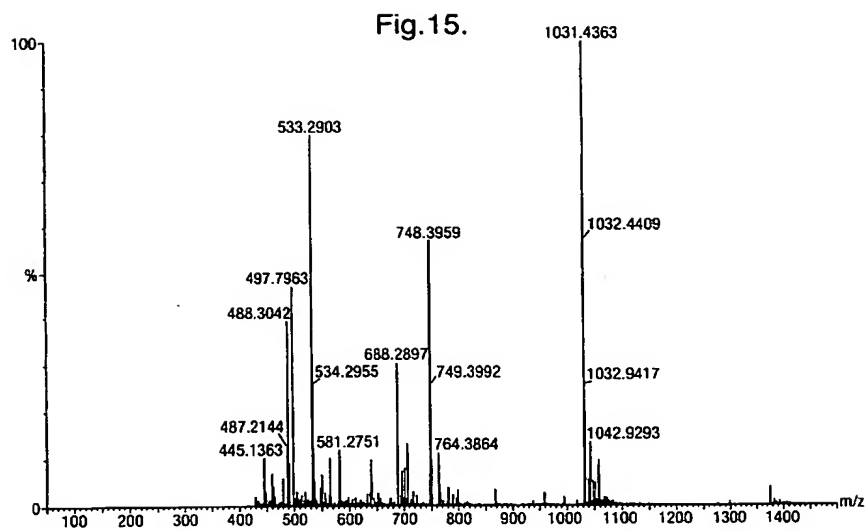
【図13】



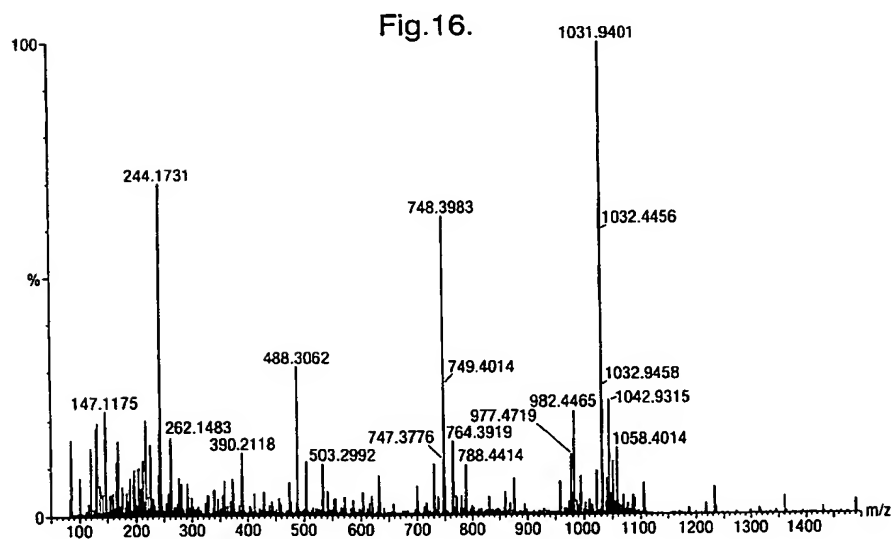
【図14】



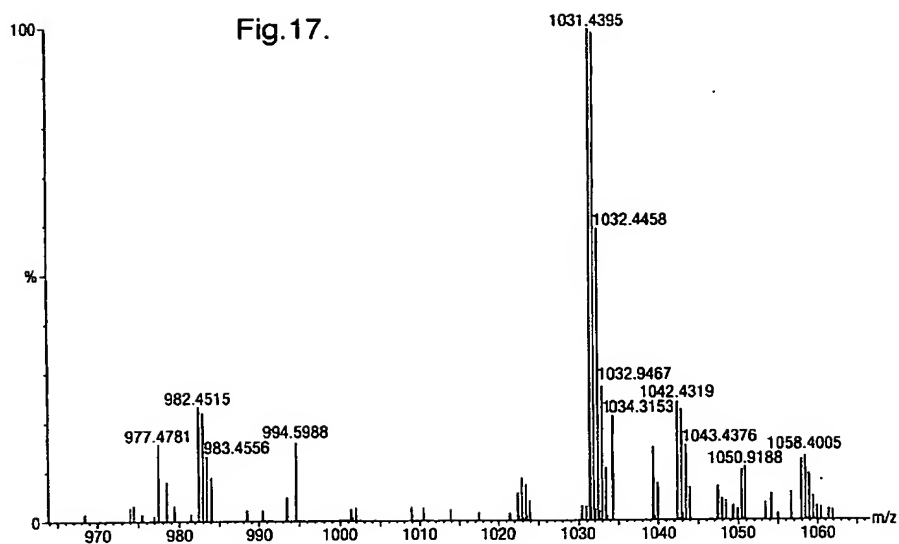
【図 15】



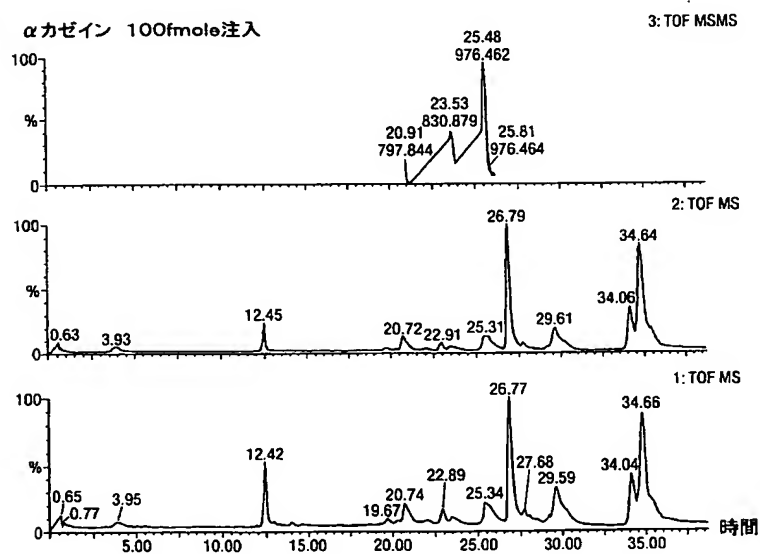
【図 16】



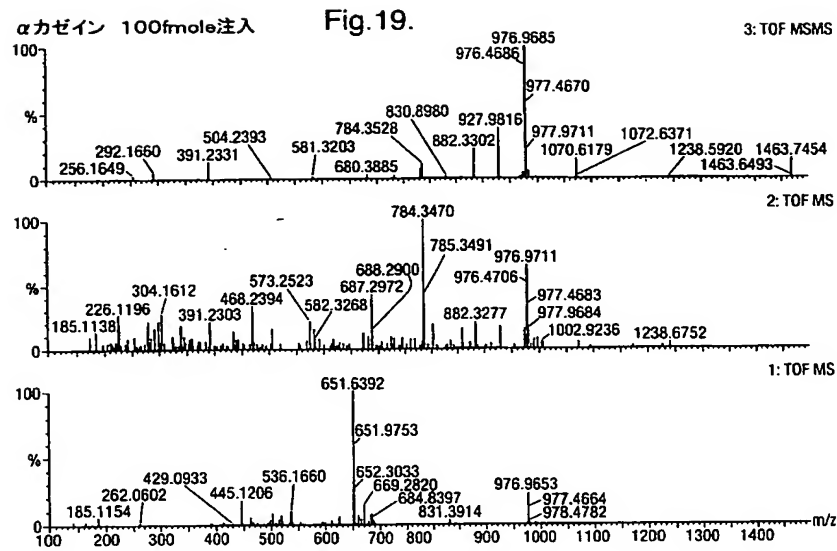
【図 17】



【図 18】

Fig.18.  $\alpha$ カゼイン 100fmole注入

【図19】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

ターム (参考)

H O 1 J 49/10  
49/42H O 1 J 49/10  
49/42

(72) 発明者

ケビン・ジャイルズ  
イギリス国チェシャー州 ダブリュ エー  
15 7アール アール, オルトリナム, テ  
インパーリィ, ノース・ベイル・ロード,  
16F ターム (参考) 5C038 GH11 GH13 GH15 HH02 HH05  
HH16 HH26 HH28

## 【外国語明細書】

## 1 TITLE OF INVENTION

## METHODS AND APPARATUS FOR MASS SPECTROMETRY

## 2 CLAIMS

1. A method of mass spectrometry comprising the steps of:

providing an ion source (1) which generates ions;

filtering said ions so that ions having a mass-to-charge ratio within a first range are substantially transmitted and so that the transmission of ions having a mass-to-charge ratio outside of said first range is substantially reduced;

passing the filtered ions to a fragmentation means (4) operated in a first mode wherein at least a portion of the filtered ions are fragmented to produce daughter ions;

mass analysing of at least some of the ions which have passed through said fragmentation means (4) operating in said first mode;

characterised in that said method further comprises the steps of:

identifying as daughter ions, at least some ions which are determined to have a mass-to-charge ratio which falls outside of said first range;

wherein if one or more daughter ions are determined to be present, then said method further comprises the step of determining whether said one or more daughter ions correspond with one or more predetermined daughter ions, and wherein if it is determined that said one or more daughter ions does correspond with one or more predetermined daughter ions, then said method further comprises the steps of:

operating said fragmentation means (4) in a second mode wherein substantially less of the filtered ions are fragmented than in said first mode;

and then

mass analysing at least some of the ions which have passed through said

fragmentation means (4) operating in said second mode.

2. A method of mass spectrometry as claimed in claim 1, wherein said first range is variable.

3. A method of mass spectrometry as claimed in claim 1 or 2, wherein the step of mass analysing at least some of the ions which have passed through said fragmentation means (4), operating in said first mode comprises obtaining a first mass spectrum and wherein the step of mass analysing at least some of the ions which have passed through said fragmentation means (4) operating in said second mode comprises obtaining a second mass spectrum.

4. A method of mass spectrometry as claimed in claim 1, 2 or 3, wherein after the step of mass analysing at least some of the ions which have been passed through said fragmentation means (4) operating in said second mode, said method further comprises the step of identifying at least one candidate parent ion.

5. A method of mass spectrometry as claimed in claim 4 when dependent upon claim 3, wherein said at least one candidate parent ion is identified by comparing the intensity of ions having a certain mass-to-charge ratio in said first mass spectrum with the intensity of ions having the same mass-to-charge ratio in said second mass spectrum.

6. A method of mass spectrometry as claimed in claim 4 or 5, further comprising the steps of:

filtering the ions upstream of said fragmentation means (4) so that ions having a mass-to-charge ratio within a second range which includes at l

each one candidate parent ion are arranged to be substantially transmitted to said fragmentation means (4) and so that the transmission of ions having a mass-to-charge ratio outside of said second range is substantially reduced;

operating said fragmentation means (4) so that substantially more of said ions are fragmented than in said second mode; and then mass analysing at least some of the ions which have passed through said fragmentation means (4).

7. A method of mass spectrometry as claimed in claim 6, wherein said second range is selected so that only ions having mass-to-charge ratios within  $\pm x$  mass-to-charge units of a candidate parent ion are substantially transmitted to said fragmentation means (4), wherein  $x$  is selected from the group comprising: (i) 0.5; (ii) 1.0; (iii) 2.0; (iv) 5.0; (v) 10.0; (vi) 15.0; and (vii) 20.0.

8. A method of mass spectrometry as claimed in any preceding claim, wherein said ion source (1) is selected from the group comprising: (i) an electrospray ion source; (ii) an atmospheric pressure chemical ionization ion source; and (iii) a matrix assisted laser desorption ion source.

9. A method of mass spectrometry as claimed in claim 8, wherein said ion source (1) is provided with an eluent over a period of time, said eluent having been separated from a mixture by means of liquid chromatography.

10. A method of mass spectrometry as claimed in any of claims 1-7, wherein said ion source (1) is selected from the group comprising: (i) an electron impact ion source; (ii) a chemical ionization ion source; and (iii)

i) a field ionisation ion source.

11. A method of mass spectrometry as claimed in claim 10, wherein said ion source (1) is provided with an eluent over a period of time, said eluent having been separated from a mixture by means of gas chromatography.

12. A method of mass spectrometry as claimed in any preceding claim, wherein said mass analysing steps are performed by an analyser selected from the group comprising: (i) a quadrupole mass filter; (ii) a time-of-flight mass analyser; (iii) an ion trap; (iv) a magnetic sector analyser; and (v) a Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance ("FTICR") mass analyser.

13. A method of mass spectrometry as claimed in any preceding claim, wherein said filtering step(s) are performed by a multi-element ion optical lens (3), preferably a quadrupole rod set.

14. A method of mass spectrometry as claimed in claim 13, further comprising providing both a RF and a DC electric field to said multi-element ion optical lens (3).

15. A method of mass spectrometry as claimed in claim 13 or 14, wherein said multi-element ion optical lens (3) is arranged to substantially transmit only ions having mass-to-charge ratios greater than a first value.

16. A method of mass spectrometry as claimed in claim 15, wherein said first value is selected from the group comprising: (i) 100; (ii) 150; (i

ii) 200; (iv) 250; (v) 300; (vi) 350; (vii) 400; (viii) 450; and (ix) 500.

17. A method of mass spectrometry as claimed in claim 15 or 16, wherein the step of identifying daughter ions comprises identifying at least some ions which are determined to have mass-to-charge ratios less than said first value.

18. A method of mass spectrometry as claimed in any preceding claim, wherein said fragmentation means (4) comprises a collision cell selected from the group comprising: (i) a quadrupole rod set; (ii) an hexapole rod set; (iii) an octopole rod set; and (iv) an electrode ring set.

19. A method of mass spectrometry as claimed in claim 18, wherein said collision cell is operated in a RF only mode.

20. A method of mass spectrometry as claimed in claim 18 or 19, further comprising the step of providing a collision gas to said collision cell at a pressure within the range  $10^{-4}$  to  $10^{-1}$  mbar, preferably  $10^{-3}$  to  $10^{-2}$  mbar.

21. A method of mass spectrometry as claimed in any of claims 18, 19 or 20, wherein said collision cell forms a substantially gas-tight enclosure.

22. A method of mass spectrometry as claimed in any preceding claim, wherein said predetermined daughter ions comprises ions selected from the group comprising: (i) immonium ions from peptides; (ii) functional groups including phosphate group  $\text{PO}_3^-$  ions from phosphorylated peptides; and

(iii) mass tags which are intended to cleave from a specific molecule or class of molecule and to be subsequently identified thus reporting the presence of said specific molecule or class of molecule.

23. A method of mass spectrometry as claimed in any preceding claim, wherein operating said fragmentation means (4) in said first mode comprises the step of supplying a voltage to said fragmentation means (4) selected from the group comprising: (i)  $\geq 15V$ ; (ii)  $\geq 20V$ ; (iii)  $\geq 25V$ ; (iv)  $\geq 30V$ ; (v)  $\geq 50V$ ; (vi)  $\geq 100V$ ; (vii)  $\geq 150V$ ; and (viii)  $\geq 200V$ , where " $\geq$ " stands for "greater than or equal to".

24. A method of mass spectrometry as claimed in any preceding claim, wherein operating said fragmentation means (4) in said second mode comprises the step of supplying a voltage to said fragmentation means (4) selected from the group comprising: (i)  $\leq 5V$ ; (ii)  $\leq 4.5V$ ; (iii)  $\leq 4V$ ; (iv)  $\leq 3.5V$ ; (v)  $\leq 3V$ ; (vi)  $\leq 2.5V$ ; (vii)  $\leq 2V$ ; (viii)  $\leq 1.5V$ ; (ix)  $\leq 1V$ ; (x)  $\leq 0.5V$ ; and (xi) substantially  $0V$ , where " $\leq$ " stands for "greater than or equal to".

25. A method of mass spectrometry comprising the steps of:

providing an ion source (1) which generates ions;

filtering said ions so that substantially only ions having a mass-to-charge ratio greater than a first value are transmitted, said first value being between 100 and 500;

passing the filtered ions to a fragmentation means (4) operated in a first mode with an applied voltage greater than or equal to  $15V$  wherein at least a portion of the filtered ions are fragmented to produce daughter ions;

mass analysing at least some of the ions which have passed through said

fragmentation means (4) operating in said first mode;  
characterised in that said method further comprises the steps of:  
identifying as daughter ions, at least some ions which are determined to  
have mass-to-charge ratios less than said first value;  
wherein if one or more daughter ions are determined to be present, then  
said method further comprises the step of determining whether said one o  
r more daughter ions correspond with one or more predetermined daughter  
ions, and wherein if it is determined that said one or more daughter ion  
s does correspond with one or more predetermined daughter ions, then sai  
d method further comprises the steps of:  
operating said fragmentation means (4) in a second mode with an applied  
voltage less than or equal to 5V wherein substantially less of said ions  
are fragmented than in said first mode; and then  
mass analysing at least some of the ions which have passed through said  
fragmentation means (4) operating in said second mode.

26. A mass spectrometer comprising:

an ion source (1) for generating ions;

a multi-element ion optical lens (3) for filtering ions so that ions hav  
ing a mass-to-charge ratio within a first range are substantially transm  
itted and so that the transmission of ions having a mass-to-charge ratio  
outside of said first range is substantially reduced;

a fragmentation means (4) arranged and adapted to be operated in a first  
mode wherein at least a portion of the ions received by said fragmentat  
ion means (4) are fragmented to produce daughter ions;

a mass analyser for mass analysing at least some of the ions which have  
passed through said fragmentation means (4) operating in said first mode  
; and

a control system for controlling said mass spectrometer;

characterised in that:

said control system is arranged to identify as daughter ions, at least some ions which are determined to have a mass-to-charge ratio which falls outside of said first range, wherein if one or more daughter ions are determined to be present, then said control system determines whether said one or more daughter ions correspond with one or more predetermined daughter ions, and wherein if said control system determines that said one or more daughter ions does correspond with one or more predetermined daughter ions, then said control system switches said fragmentation means (4) so as to operate in a second mode wherein substantially less of the ions received by said fragmentation means (4) are fragmented than in said first mode and whereupon said mass analyser is arranged to mass analyse at least some of the ions which have passed through said fragmentation means (4) operating in said second mode.

27. A mass spectrometer as claimed in claim 26, wherein said mass analyser is selected from the group comprising: (i) a quadrupole mass filter; (ii) a time-of-flight mass analyser; (iii) an ion trap; (iv) a magnetic sector analyser; and (v) a Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance ("FTICR") mass analyser.

28. A mass spectrometer as claimed in claim 26 or 27, wherein said multi-element ion optical lens (3) comprises a quadrupole mass filter.

29. A mass spectrometer as claimed in claim 26, 27 or 28, wherein said fragmentation means (4) comprises a collision cell selected from the group comprising: (i) a quadrupole rod set; (ii) an hexapole rod set; (iii) an octopole rod set; and (iv) an electrode ring set.

30. A mass spectrometer; as claimed in claim 29, wherein said collision cell forms a substantially gas-tight enclosure.

31. A mass spectrometer comprising:

an ion source (1) for generating ions;

a multi-element ion optical lens (3) for filtering ions so that ions having a mass-to-charge ratio greater than a first value are substantially transmitted and so that the transmission of ions having a mass-to-charge ratio less than said first value is substantially reduced, said first value being between 100 and 500;

a fragmentation means (4) arranged and adapted to be operated in a first mode with an applied voltage greater than or equal to 15V wherein at least a portion of the ions received by said fragmentation means (4) are fragmented to produce daughter ions; and

a mass analyser for mass analysing at least some of the ions which have passed through said fragmentation means (4) operating in said first mode;

wherein:

said mass spectrometer is configured to identify as daughter ions, at least some ions which are determined to have a mass-to-charge ratio which is less than said first value, wherein if one or more daughter ions are determined to be present, then said mass spectrometer is arranged to determine whether said one or more daughter ions correspond with one or more predetermined daughter ions, and wherein if it is determined that said one or more daughter ions does correspond with one or more predetermined daughter ions, then said mass spectrometer is arranged and adapted to switch said fragmentation means (4) so as to operate in a second mode with an applied voltage less than or equal to 5V wherein substantially less of the ions received by said fragmentation means (4) are fragmented th

an in said first mode and whereupon said mass analyser is arranged to mass analyse at least some of the ions which have passed through said fragmentation means (4) operating in said second mode.

32. Apparatus arranged and adapted to perform the method of any of claims 1-25.

33. A method of mass spectrometry comprising the steps of:

providing an ion source (1) which generates ions;

characterised in that said method further comprises the steps of:

passing the ions to a fragmentation means (4) which operates in at least

a first mode wherein at least a portion of the ions are fragmented to produce daughter ions and a second mode wherein substantially less of the ions are fragmented than in said first mode;

mass analysing at least some of the ions which have passed through said fragmentation means (4) operating in said first mode;

mass analysing at least some of the ions which have passed through said fragmentation means (4) operating in said second mode;

identifying at least one daughter ion and at least one candidate parent ion; and

determining whether: (i) said at least one daughter ion corresponds with one or more predetermined daughter ions; and/or (ii) said at least one daughter ion and said at least one candidate parent ion could be related by the loss of a predetermined ion or neutral particle.

34. A method of mass spectrometry as claimed in claim 33, further comprising: filtering the ions upstream of said fragmentation means (4) so that ions having a mass-to-charge ratio within a first range are substantially transmitted and so that the transmission of ions having a mass-to

-charge ratio outside of said first range is substantially reduced.

35. A method of mass spectrometry as claimed in claim 34, wherein said first range is variable.

36. A method of mass spectrometry as claimed in claim 34 or 35, wherein the step of identifying at least one daughter ion comprises determining at least some ions which have a mass-to-charge ratio which falls outside of said first range.

37. A method of mass spectrometry as claimed in any of claims 33-36, wherein the step of mass analysing at least some of the ions which have passed through said fragmentation means (4) operating in said first mode comprises obtaining a first mass spectrum and wherein the step of mass analysing at least some of the ions which have passed through said fragmentation means (4) operating in said second mode comprises obtaining a second mass spectrum.

38. A method of mass spectrometry as claimed in claim 37, wherein said at least one candidate parent ion is identified by comparing the intensity of ions having a certain mass-to-charge ratio in said first mass spectrum with the intensity of ions having the same mass-to-charge ratio in said second mass spectrum.

39. A method of mass spectrometry as claimed in claim 37 or 38, wherein said at least one daughter ion is identified by comparing the intensity of ions having a certain mass-to-charge ratio in said first mass spectrum with the intensity of ions having the same mass-to-charge ratio in said second mass spectrum.

40. A method of mass spectrometry as claimed in any of claims 33-39, wherein if it is determined that: (i) said at least one daughter ion corresponds with a predetermined daughter ion; and/or (ii) said at least one daughter ion and said at least one candidate parent ion could be related by the loss of a predetermined ion or neutral particle, then said method further comprises the steps of:

filtering the ions upstream of said fragmentation means (4) so that ions having a mass-to-charge ratio within a second range which includes at least one candidate parent ion are arranged to be substantially transmitted to said fragmentation means (4) and so that the transmission of ions having a mass-to-charge ratio outside of said second range is substantially reduced;

operating said fragmentation means (4) so that substantially more of said ions are fragmented than in said second mode; and

mass analysing at least some of the ions which have passed through said fragmentation means (4).

41. A method of mass spectrometry as claimed in claim 40, wherein said second range is selected so that only ions having mass-to-charge ratios within  $\pm x$  mass-to-charge units of a candidate parent ion are substantially transmitted to said fragmentation means (4), wherein  $x$  is selected from the group comprising: (i) 0.5; (ii) 1.0; (iii) 2.0; (iv) 5.0; (v) 10.0; (vi) 15.0; and (vii) 20.0.

42. A method of mass spectrometry as claimed in any of claims 33-41, wherein said ion source (1) is selected from the group comprising: (i) an electrospray ion source; (ii) an atmospheric pressure chemical ionization ion source; and (iii) a matrix assisted laser desorption ion source.

43. A method of mass spectrometry as claimed in claim 42, wherein said ion source (1) is provided with an eluent over a period of time, said eluent having been separated from a mixture by means of liquid chromatography.

44. A method of mass spectrometry as claimed in any of claims 33-41, wherein said ion source (1) is selected from the group comprising: (i) an electron impact ion source; (ii) a chemical ionization ion source; and (iii) a field ionisation ion source.

45. A method of mass spectrometry as claimed in claim 44, wherein said ion source (1) is provided with an eluent over a period of time, said eluent having been separated from a mixture by means of gas chromatography.

46. A method of mass spectrometry as claimed in any of claims 33-45, wherein said mass analysing steps are performed by an analyser selected from the group comprising: (i) a quadrupole mass filter; (ii) a time-of-flight mass analyser; (iii) an ion trap; (iv) a magnetic sector analyser; and (v) a Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance ("FTICR") mass analyser.

47. A method of mass spectrometry as claimed in any preceding claim wherein dependent upon claim 34 or 40, wherein said filtering step(s) are performed by a multi-element ion optical lens (3), preferably a quadrupole mass filter.

48. A method of mass spectrometry as claimed in claim 47, further compr

ising providing both a RF and a DC electric field to said multi-element ion optical lens (3).

49. A method of mass spectrometry as claimed in claim 47 or 48, wherein said multi-element ion optical lens (3) is arranged to substantially transmit only ions having mass-to-charge ratios greater than a first value.

50. A method of mass spectrometry as claimed in claim 49, wherein said first value is selected from the group comprising: (i) 100; (ii) 150; (iii) 200; (iv) 250; (v) 300; (vi) 350; (vii) 400; (viii) 450; and (ix) 500.

51. A method of mass spectrometry as claimed in claim 49 or 50, wherein the step of identifying daughter ions comprises identifying at least some ions which are determined to have mass-to-charge ratios less than said first value.

52. A method of mass spectrometry as claimed in any of claims 33-51, wherein said fragmentation means (4) comprises a collision cell selected from the group comprising: (i) a quadrupole rod set; (ii) an hexapole rod set; (iii) an octopole rod set; and (iv) an electrode ring set.

53. A method of mass spectrometry as claimed in claim 52, wherein said collision cell is operated in a RF only mode.

54. A method of mass spectrometry as claimed in claim 52 or 53, further comprising the step of providing a collision gas to said collision cell at a pressure within the range  $10^{-3}$  to  $10^{-1}$  mbar, preferably  $10^{-3}$  to  $10^{-2}$  mbar.

-2 mbar.

55. A method of mass spectrometry as claimed in any of claims 52, 53 or 54, wherein said collision cell forms a substantially gas-tight enclosure.

56. A method of mass spectrometry as claimed in any of claims 33-55, wherein said predetermined daughter ions comprises ions selected from the group comprising: (i) immonium ions from peptides; (ii) functional groups including phosphate group  $\text{PO}_3^-$  ions from phosphorylated peptides; and (iii) mass tags which are intended to cleave from a specific molecule or class of molecule and to be subsequently identified thus reporting the presence of said specific molecule or class of molecule.

57. A method of mass spectrometry as claimed in any of claims 33-56, wherein operating said fragmentation means (4) in said first mode comprises the step of supplying a voltage to said fragmentation means (4) selected from the group comprising: (i)  $\geq 15\text{V}$ ; (ii)  $\geq 20\text{V}$ ; (iii)  $\geq 25\text{V}$ ; (iv)  $\geq 30\text{V}$ ; (v)  $\geq 50\text{V}$ ; (vi)  $\geq 100\text{V}$ ; (vii)  $\geq 150\text{V}$ ; and (viii)  $\geq 200\text{V}$ , where " $\geq$ " stands for "greater than or equal to".

58. A method of mass spectrometry as claimed in any of claims 33-57, wherein operating said fragmentation means (4) in said second mode comprises the step of supplying a voltage to said fragmentation means (4) selected from the group comprising: (i)  $\leq 5\text{V}$ ; (ii)  $\leq 4.5\text{V}$ ; (iii)  $\leq 4\text{V}$ ; (iv)  $\leq 3.5\text{V}$ ; (v)  $\leq 3\text{V}$ ; (vi)  $\leq 2.5\text{V}$ ; (vii)  $\leq 2\text{V}$ ; (viii)  $\leq 1.5\text{V}$ ; (ix)  $\leq 1\text{V}$ ; (x)  $\leq 0.5\text{V}$ ; and (xi) substantially  $0\text{V}$ , where " $\leq$ " stands for "less than or equal to".

59. A method of mass spectrometry comprising the steps of:  
providing an ion source (1) which generates ions;  
characterised in that said method further comprises the steps of:  
passing the ions to a fragmentation means (4) which operates in at least  
a first mode with an applied voltage greater than or equal to 15V where  
in at least a portion of the ions are fragmented to produce daughter ions  
and a second mode with an applied voltage less than or equal to 5V where  
in substantially less of the ions are fragmented than in said first mode;  
mass analysing at least some of the ions which have passed through said  
fragmentation means (4) operating in said first mode;  
mass analysing at least some of the ions which have passed through said  
fragmentation means (4) operating in said second mode;  
identifying at least one daughter ion and at least one candidate parent  
ion; and  
determining whether: (i) said at least one daughter ion corresponds with  
one or more predetermined daughter ions; and/or (ii) said at least one  
daughter ion and said at least one candidate parent ion could be related  
by the loss of a predetermined ion or neutral particle.

60. A mass spectrometer comprising:  
an ion source (1) for generating ions;  
a fragmentation means (4) switchable between at least a first mode where  
in at least a portion of the ions received by said fragmentation means (4)  
are fragmented to produce daughter ions and a second mode wherein substantially  
less of the ions are fragmented than in said first mode;  
a mass analyser for mass analysing at least some of the ions which have  
passed through said fragmentation means (4) operating in said first mode  
and for mass analysing at least some of the ions which have passed thro

ugh said fragmentation means (4) operating in said second mode; and  
a control system for controlling said mass spectrometer;  
wherein said control system is arranged to identify at least one daughter  
r ion and at least one candidate parent ion and to determine whether: (i  
) said at least one daughter ion corresponds with one or more predetermi  
ned daughter ions; and/or (ii) said at least one daughter ion and said a  
t least one candidate parent ion could be related by the loss of a prede  
termined ion or neutral particle.

61. A mass spectrometer as claimed in claim 60, wherein said mass analy  
ser is selected from the group comprising: (i) a quadrupole mass filter;  
(ii) a time-of-flight mass analyser; (iii) an ion trap; (iv) a magnetic  
sector analyser; and (v) a Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance ("FTICR") mass analyser.

62. A mass spectrometer as claimed in claim 60 or 61, further compris  
g a multi-element ion optical lens (3) for filtering ions so that ions h  
aving a mass-to-charge ratio within a first range are substantially tran  
smitted and so that the transmission of ions having a mass-to-charge rat  
io outside of said first range is substantially reduced.

63. A mass spectrometer as claimed in claim 62, wherein said multi-elem  
ent ion optical lens (3) comprises a quadrupole mass filter.

64. A mass spectrometer as claimed in any of claims 60-63, wherein said  
fragmentation means (4) comprises a collision cell selected from the gr  
oup comprising: (i) a quadrupole rod set; (ii) an hexapole rod set; (iii  
) an octopole rod set; and (iv) an electrode ring set.

65. A mass spectrometer as claimed in claim 64, wherein said collision cell forms a substantially gas-tight enclosure.

66. A mass spectrometer comprising:

an ion source (1) for generating ions;

a fragmentation means (4) switchable between at least a first mode with an applied voltage greater than or equal to 15V wherein at least a portion of the ions received by said fragmentation means (4) are fragmented to produce daughter ions and a second mode with an applied voltage less than or equal to 5V wherein substantially less of the ions are fragmented than in said first mode; and

a mass analyser for mass analysing at least some of the ions which have passed through said fragmentation means (4) operating in said first mode and for mass analysing at least some of the ions which have passed through said fragmentation means (4) operating in said second mode; wherein said mass spectrometer is configured to identify at least one daughter ion and at least one candidate parent ion and to determine whether: (i) said at least one daughter ion corresponds with one or more predetermined daughter ions; and/or (ii) said at least one daughter ion and said at least one candidate parent ion could be related by the loss of a predetermined ion or neutral particle.

67. Apparatus arranged and adapted to perform the method of any of claims 33-59.

### 3 DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION

The present invention relates to methods and apparatus for mass spectrometry.

Tandem mass spectrometry (MS/MS) is the name given to the method of mass

spectrometry wherein parent ions generated from a sample are selected by a first mass filter/analyser and are then passed to a collision cell wherein they are fragmented by collisions with neutral gas molecules to yield daughter (or "product") ions. The daughter ions are then mass analysed by a second mass filter/analyser, and the resulting daughter ion spectra can be used to determine the structure of the parent (or "precursor") ion. Tandem mass spectrometry is particularly useful for the analysis of complex mixtures such as biomolecules since it avoids the need for chemical clean-up prior to mass spectral analysis.

A particular form of tandem mass spectrometry referred to as parent ion scanning is known, wherein in a first step the second mass filter/analyser is arranged to act as a mass filter so that it will only transmit and detect daughter ions having a specific mass-to-charge ratio. The specific mass-to-charge ratio is set so as to correspond with the mass-to-charge ratio of daughter ions which are known to be characteristic products which result from the fragmentation of a particular parent ion or type of parent ion. The first mass filter/analyser upstream of the collision cell is then scanned whilst the second mass filter/analyser remains fixed to monitor for the presence of daughter ions having the specific mass-to-charge ratio. The parent ion mass-to-charge ratios which yield the characteristic daughter ions can then be determined. As a second step, a complete daughter ion spectrum for each of the parent ion mass-to-charge ratios which produce characteristic daughter ions may then be obtained by operating the first mass filter/analyser so that it selects parent ions having a particular mass-to-charge ratio, and scanning the second mass filter/analyser to record the resulting full daughter ion spectrum.

This can then be repeated for the other parent ions of interest. Parent ion scanning is useful when it is not possible to identify parent ions in a direct mass spectrum due to the presence of chemical noise, which

is frequently encountered, for example, in the electrospray mass spectra of biomolecules.

Triple quadrupole mass spectrometers having a first quadrupole mass filter/analyser, a quadrupole collision cell into which a collision gas is introduced, and a second quadrupole mass filter/analyser are well known.

Another type of mass spectrometer (a hybrid quadrupole-time of flight mass spectrometer) is known wherein the second quadrupole mass filter/analyser is replaced by an orthogonal time of flight mass analyser.

As will be shown below, both types of mass spectrometers when used to perform conventional methods of parent ion scanning and subsequently obtaining a daughter ion spectrum of a candidate parent ion suffer from low duty cycles which render them unsuitable for use in applications which require a higher duty cycle i.e. when used in on-line chromatography applications.

Quadrupoles have a duty cycle of approximately 100% when being used as a mass filter, but their duty cycle drops to around 0.1% when they are used in a scanning mode as a mass analyser, for example, to mass analyse a mass range of 500 mass units with peaks one mass unit wide at their base.

Orthogonal acceleration time of flight analysers typically have a duty cycle within the range 1-20% depending upon the relative  $m/z$  values of the different ions in the spectrum. However, the duty cycle remains the same irrespective of whether the time of flight analyser is being used as a mass filter to transmit ions having a particular mass to charge ratio, or whether the time of flight analyser is being used to record a full mass spectrum. This is due to the nature of operation of time of flight analysers. When used to acquire and record a daughter ion spectrum the duty cycle of a time of flight analyser is typically around 5%.

To a first approximation the conventional duty cycle when seeking to discover candidate parent ions using a triple quadrupole mass spectrometer is approximately 0.1% (the first quadrupole mass filter/analyser is scanned with a duty cycle of 0.1% and the second quadrupole mass filter/analyser acts as a mass filter with a duty cycle of 100%). The duty cycle when then obtaining a daughter ion spectrum for a particular candidate parent ion is also approximately 0.1% (the first quadrupole mass filter/analyser acts as a mass filter with a duty cycle of 100%, and the second quadrupole mass filter/analyser is scanned with a duty cycle of approximately 0.1%). The resultant duty cycle therefore of discovering a number of candidate parent ions and producing a daughter spectrum of one of the candidate parent ions is approximately  $0.1\% / 2$  (due to a two stage process with each stage having a duty cycle of 0.1%) = 0.05%.

The duty cycle of a quadrupole-time of flight mass spectrometer for discovering candidate parent ions is approximately 0.005% (the quadrupole is scanned with a duty cycle of approximately 0.1% and the time of flight analyser acts as a mass filter with a duty cycle of approximately 5%). Once candidate parent ions have been discovered, a daughter ion spectrum of a candidate parent ion can be obtained with an duty cycle of 5% (the quadrupole acts as a mass filter with a duty cycle of approximately 100% and the time of flight analyser is scanned with a duty cycle of 5%). The resultant duty cycle therefore of discovering a number of candidate parent ions and producing a daughter spectrum of one of the candidate parent ions is approximately 0.005% (since  $0.005\% \ll 5\%$ ).

As can be seen, a triple quadrupole has approximately an order higher duty cycle than a quadrupole-time of flight mass spectrometer for performing conventional methods of parent ion scanning and obtaining confirmatory daughter ion spectra of discovered candidate parent ions. However, such duty cycles are not high enough to be used practically and efficiently.

y for analysing real time data which is required when the source of ions is the eluent from a chromatography device.

Electrospray and laser desorption techniques have made it possible to generate molecular ions having very high molecular weights, and time of flight mass analysers are advantageous for the analysis of such large mass biomolecules by virtue of their high efficiency at recording a full mass spectrum. They also have a high resolution and mass accuracy.

Other forms of mass analysers such as quadrupole ion traps are similar in some ways to time of flight analysers, in that like time of flight analysers, they can not provide a continuous output and hence have a low efficiency if used as a mass filter to continuously transmit ions which is an important feature of the conventional methods of parent ion scanning. Both time of flight mass analysers and quadrupole ion traps may be termed "discontinuous output mass analysers".

It is therefore desired to provide improved methods and apparatus for mass spectrometry, and according to a preferred embodiment to provide improved methods and apparatus which can identify candidate parent ions faster than conventional methods which would be suitable for use in chromatography applications on a real time basis.

According to a first embodiment and first aspect of the present invention, there is provided a method of mass spectrometry as claimed in claim 1.

According to the preferred embodiment of the present invention, the first step of discovering candidate parent ions can be performed with a duty cycle of 2.5% (the quadrupole mass filter has a duty cycle of 100% and the time of flight analyser has a duty cycle of 5%, but two experimental runs need to be performed, one with the collision cell operated in a high fragmentation mode and the other with the collision cell operated in

a low fragmentation mode, thereby halving the resultant duty cycle from 5% to 2.5%). The second step of confirming the identity of a particular candidate parent ion by performing a full daughter spectrum of the candidate parent ion can be performed with a duty cycle of 5% (the quadrupole again operates as a mass filter with approximately 100% duty cycle and the time of flight analyser acts as an analyser with a duty cycle of approximately 5%). Accordingly, only three experimental runs are required in order to discover a number of candidate parent ions and to produce a daughter ion spectrum of one of the candidate parent ions, each experimental run having a duty cycle of 5%. The resultant overall duty cycle is therefore  $5\% / 3 = 1.67\%$ .

The preferred embodiment therefore has a duty cycle which is approximately 30 times better than that of the conventional method performed on a triple quadrupole arrangement, and shows an improvement greater than 300 times compared with the conventional method performed on a quadrupole-time of flight mass spectrometer. Such an improvement enables the apparatus and method according to the preferred embodiment to be used effectively at on-line chromatography time scales.

When the fragmentation means is operated in the first mode, a high voltage is applied to the fragmentation means which causes the ions passing therethrough to fragment. However, when the fragmentation means is operated in the second mode then the ions are substantially less fragmented and there is a higher proportion of molecular ions which are transmitted therethrough.

Preferably, operating the fragmentation means in the first mode comprises the step of supplying a voltage to the fragmentation means selected from the group comprising: (i)  $\geq 15V$ ; (ii)  $\geq 20V$ ; (iii)  $\geq 25V$ ; (iv)  $\geq 30V$ ; (v)  $\geq 50V$ ; (vi)  $\geq 100V$ ; (vii)  $\geq 150V$ ; and (viii)  $\geq 200V$ , where " $\geq$ " stands for "greater than or equal to". Preferably, operating the fr

fragmentation means in the second mode comprises the step of supplying a voltage to the fragmentation means selected from the group comprising: (i)  $\leq 5V$ ; (ii)  $\leq 4.5V$ ; (iii)  $\leq 4V$ ; (iv)  $\leq 3.5V$ ; (v)  $\leq 3V$ ; (vi)  $\leq 2.5V$ ; (vii)  $\leq 2V$ ; (viii)  $\leq 1.5V$ ; (ix)  $\leq 1V$ ; (x)  $\leq 0.5V$ ; and (xi) substantially  $0V$ , where " $\leq$ " stands for "less than or equal to". However, according to less preferred arrangements for both the first and second embodiments of the present invention, a voltage between  $5V$  and  $15V$  could be used for the first mode and/or the second mode. In such circumstances it would be expected that a proportion of the ions in the high energy mode would not actually be fragmented and similarly, in the low energy mode, a proportion of the ions would be fragmented.

In order to filter the ions, a first mass filter upstream of a fragmentation means, e.g. a collision cell, is preferably arranged so that only ions having a mass-to-charge ratio (hereinafter " $m/z$ ") greater than a certain  $m/z$  are transmitted i.e. according to a preferred embodiment the first mass filter is initially set to operate as a high pass filter. The cutoff point may be set so that it is a little higher than the  $m/z$  value of the characteristic daughter ion which is being monitored for. For example, if the characteristic daughter ion is known to have a  $m/z$  value of  $300$ , then the first mass filter may be set to only transmit ions having a  $m/z$  greater than say  $350$ . Therefore, if an ion having a  $m/z$  value of  $300$  is subsequently detected by the mass analyser, then it follows that the ion must be a daughter ion caused by fragmentation of a parent ion in the fragmentation means since parent ions having this  $m/z$  would be filtered out by the first mass filter.

Preferably, the first range is variable. The range of ions transmitted by the first mass filter can therefore be altered every scan if necessary.

Preferably, the step of mass analysing at least some of the ions which h

have passed through the fragmentation means operating in the first mode comprises obtaining a first mass spectrum and wherein the step of mass analysing at least some of the ions which have passed through the fragmentation means operating in the second mode comprises obtaining a second mass spectrum.

Preferably, after the step of mass analysing at least some of the ions which have been passed through the fragmentation means operating in the second mode, the method further comprises the step of identifying at least one candidate parent ion. The at least one candidate parent ion is preferably identified by comparing the intensity of ions having a certain mass-to-charge ratio in the first mass spectrum with the intensity of ions having the same mass-to-charge ratio in the second mass spectrum. If a high intensity peak is found in the low energy spectrum but not in the high energy spectrum then it is likely that the peak represents a candidate parent ion.

Preferably, the method further comprises the steps of: filtering the ions upstream of the fragmentation means so that ions having a mass-to-charge ratio within a second range which includes at least one candidate parent ion are arranged to be substantially transmitted to the fragmentation means and so that the transmission of ions having a mass-to-charge ratio outside of the second range is substantially reduced; operating the fragmentation means so that substantially more of the ions are fragmented than in the second mode; and then mass analysing at least some of the ions which have passed through the fragmentation means. In other words, once a candidate parent ion has been identified, then the first mass filter is preferably set to operate as a narrow bandpass filter substantially only allowing ions at the  $m/z$  value of a particular candidate parent ion to be transmitted. According to a preferred embodiment, the second range is selected so that only ions having mass-to-charge ratios within

$\pm x$  mass-to-charge units of a candidate parent ion are substantially transmitted to the fragmentation means (4), wherein  $x$  is selected from the group comprising: (i) 0.5; (ii) 1.0; (iii) 2.0; (iv) 5.0; (v) 10.0; (vi) 15.0; and (vii) 20.0. The mass spectrometer therefore operates in a tandem MS mode.

Preferably, the ion source is selected from the group comprising: (i) an electrospray ion source; (ii) an atmospheric pressure chemical ionization ion source; and (iii) a matrix assisted laser desorption ion source.

Such ion sources, especially the first two, may be provided with an eluent over a period of time, the eluent having been separated from a mixture by means of liquid chromatography.

Preferably, the ion source is selected from the group comprising: (i) an electron impact ion source; (ii) a chemical ionization ion source; and (iii) a field ionisation ion source. Such ion sources may be provided with an eluent over a period of time, the eluent having been separated from a mixture by means of gas chromatography.

Preferably, the mass analysing steps are performed by an analyser selected from the group comprising: (i) a quadrupole mass filter; (ii) a time-of-flight mass analyser; (iii) an ion trap; (iv) a magnetic sector analyser; and (v) a Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance ("FTICR") mass analyser. A time-of-flight mass analyser is particularly preferred.

Preferably, the filtering step(s) are performed by a multi-element ion optical lens, preferably a quadrupole rod set, which is further preferably provided with both a RF and a DC electric field.

Preferably, the multi-element ion optical lens is arranged to substantially transmit only ions having mass-to-charge ratios greater than a first value. Further preferably, the first value is selected from the group comprising: (i) 100; (ii) 150; (iii) 200; (iv) 250; (v) 300; (vi) 350; (vii) 400; (viii) 450; and (ix) 500. The step of identifying daughter io

ns in a preferred embodiment comprises identifying at least some ions which are determined to have mass-to-charge ratios less than the first value.

Preferably, the fragmentation means comprises a collision cell selected from the group comprising: (i) a quadrupole rod set; (ii) an hexapole rod set; (iii) an octopole rod set; and (iv) an electrode ring set. Further preferably, the collision cell is operated in a RF only mode and in a preferred arrangement is provided with a collision gas at a pressure within the range  $10^{-4}$  to  $10^{-1}$  mbar, preferably  $10^{-3}$  to  $10^{-2}$  mbar. Further preferably, the collision cell forms a substantially gas-tight enclosure. The collision gas may preferably comprise helium, argon, nitrogen, air or methane.

Preferably, the predetermined daughter ions comprises ions selected from the group comprising: (i) immonium ions from peptides; (ii) functional groups which includes, for example, phosphate group  $\text{PO}_3^-$  ions from phosphorylated peptides; and (iii) mass tags which are intended to cleave from a specific molecule or class of molecule and to be subsequently identified thus reporting the presence of the specific molecule or class of molecule.

According to a preferred embodiment it is possible to search for candidate parent ions by interrogating the high collision energy MS spectrum (i.e. daughter ion spectrum) for more than one characteristic daughter ion. This may be particularly relevant when the parent ions have been "tagged" with a specific mass tag. A mixture of two or more parent ions may be tagged each with a different mass tag and which could be discovered by simultaneously monitoring for two or more characteristic daughter ions. Hence, parent ions from two or more different classes of compounds could be discovered in the same set of experiments.

According to a second aspect of the present invention there is provided

a method of mass spectrometry as claimed in claim 25.

According to a third aspect of the present invention, there is provided a mass spectrometer as claimed in claim 26. The implementation of the various steps by a control system, preferably an automatic control system, is merely a preferred feature. In a less preferred embodiment some of the method steps could involve human interaction from an operator.

According to a fourth aspect of the present invention, there is provided a mass spectrometer as claimed in claim 31.

According to a fifth aspect of the present invention, there is provided apparatus arranged and adapted to perform the method of any of claims 1-25. In a less preferred embodiment some of the method steps may involve human interaction with an operator.

According to a second embodiment and sixth aspect of the present invention, there is provided a method of mass spectrometry as claimed in claim 33.

Whereas in the first embodiment, the fragmentation means was operated in the second mode (where there was a lesser degree of fragmentation) only once a daughter ion of interest had been identified, according to the second embodiment the fragmentation means preferably switches back and forth between the high and low energy modes i.e. a parent ion spectrum may be obtained without having first determined (or irrespective of) whether, for example, a predetermined daughter ion has been determined to be present.

Three different modes of operation (or sub-embodiments) are contemplated by the second embodiment. In a first mode of operation it is only necessary to determine whether a predetermined daughter ion is present in the daughter ion spectrum. In this particular mode it is not strictly necessary for a candidate parent ion to have first been identified, although this is preferable. In a second mode of operation it is determined wh

either there could be some connection between at least one daughter ion and at least one candidate parent ion by virtue of the loss of a predetermined ion (such as, for example, a functional group) or the loss of a neutral particle. A third mode of operation is also contemplated in which the determining steps of both the first and second modes of operation may be performed.

Preferably, the method further comprises the step of filtering the ions upstream of the fragmentation means so that ions having a mass-to-charge ratio within a first range are substantially transmitted and so that the transmission of ions having a mass-to-charge ratio outside of the first range is substantially reduced.

Preferably, the first range is variable and hence may be altered each scan.

Preferably, the step of identifying at least one daughter ion comprises determining at least some ions which have a mass-to-charge ratio which falls outside of the first range. According to the second embodiment, identifying a daughter ion on the basis of the daughter ion having a  $m/z$  lower than the cut-off value of a first mass filter is only one way of identifying a daughter ion. Other ways of identifying a daughter ion are also contemplated.

Preferably, the step of mass analysing at least some of the ions which have passed through the fragmentation means operating in the first mode comprises obtaining a first mass spectrum and wherein the step of mass analysing at least some of the ions which have passed through the fragmentation means operating in the second mode comprises obtaining a second mass spectrum.

Preferably, the at least one candidate parent ion is identified by comparing the intensity of ions having a certain mass-to-charge ratio in the first (daughter ion) mass spectrum with the intensity of ions having the

same mass-to-charge ratio in the second (parent ion) mass spectrum. Preferably, the at least one daughter ion is identified by comparing the intensity of ions having a certain mass-to-charge ratio in the first mass spectrum with the intensity of ions having the same mass-to-charge ratio in the second mass spectrum. A candidate parent ion will preferably have a much higher intensity in said second mass spectrum compared with said first spectrum (and vice versa for a daughter ion).

Preferably, if it is determined that: (i) the at least one daughter ion corresponds with a predetermined daughter ion; and/or (ii) the at least one daughter ion and the at least one candidate parent ion could be related by the loss of a predetermined ion or neutral particle, then the method further comprises the steps of: filtering the ions upstream of fragmentation means so that ions having a mass-to-charge ratio within a second range which includes at least one candidate parent ion are arranged to be substantially transmitted to the fragmentation means and so that the transmission of ions having a mass-to-charge ratio outside of the second range is substantially reduced; operating the fragmentation means so that substantially more of the ions are fragmented than in the second mode; and

mass analysing at least some of the ions which have passed through the fragmentation means. In other words once a daughter ion of interest or an interesting connection or relationship between a parent ion and a daughter ion has been established, then the mass spectrometer switches to operate in a tandem MS mode.

Preferably, the second range is selected so that only ions having mass-to-charge ratios within  $\pm x$  mass-to-charge units of a candidate parent ion are substantially transmitted to the fragmentation means, wherein  $x$  is selected from the group comprising: (i) 0.5; (ii) 1.0; (iii) 2.0; (iv) 5.0; (v) 10.0; (vi) 15.0; and (vii) 20.0. The mass filter upstream of

the collision cell therefore preferably operates as a narrow bandpass filter.

Preferably, the ion source is selected from the group comprising: (i) an electrospray ion source; (ii) an atmospheric pressure chemical ionization ion source; and (iii) a matrix assisted laser desorption ion source. Preferably, such an ion source, especially the first two, is provided with an eluent over a period of time, the eluent having been separated from a mixture by means of liquid chromatography.

Preferably, the ion source is selected from the group comprising: (i) an electron impact ion source; (ii) a chemical ionization ion source; and (iii) a field ionisation ion source. Preferably, such an ion source is provided with an eluent over a period of time, the eluent having been separated from a mixture by means of gas chromatography.

Preferably, the mass analysing steps are performed by an analyser selected from the group comprising: (i) a quadrupole rod set; (ii) a time-of-flight mass analyser; (iii) an ion trap; (iv) a magnetic sector analyser; and (v) a Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance ("FTICR") mass analyser. A time-of-flight mass analyser is particularly preferred.

Preferably, the filtering step(s) are performed by a multi-element ion optical lens, preferably a quadrupole mass filter. Further preferably, both a RF and a DC electric field are applied to the multi-element ion optical lens.

Preferably, the multi-element ion optical lens is arranged to substantially transmit only ions having mass-to-charge ratios greater than a first value. Further preferably, the first value is selected from the group comprising: (i) 100; (ii) 150; (iii) 200; (iv) 250; (v) 300; (vi) 350; (vii) 400; (viii) 450; and (ix) 500. Preferably, the step of identifying daughter ions comprises identifying at least some ions which are determined to have mass-to-charge ratios less than the first value.

Preferably, the fragmentation means comprises a collision cell selected from the group comprising: (i) a quadrupole rod set; (ii) an hexapole rod set; (iii) an octopole rod set; and (iv) an electrode ring set. Preferably, the collision cell is operated in a RF-only mode, and is further preferably provided with a collision gas at a pressure within the range  $10^{-3}$  to  $10^{-1}$  mbar, preferably  $10^{-3}$  to  $10^{-2}$  mbar. Preferably, the collision cell forms a substantially gas-tight enclosure.

Preferably, the predetermined daughter ions comprises ions selected from the group comprising: (i) immonium ions from peptides; (ii) functional groups including phosphate group  $\text{PO}_3^-$  ions from phosphorylated peptides; and (iii) mass tags which are intended to cleave from a specific molecule or class of molecule and to be subsequently identified thus reporting the presence of the specific molecule or class of molecule.

Preferably, operating the fragmentation means in the first mode comprises the step of supplying a voltage to the fragmentation means selected from the group comprising: (i)  $\geq 15\text{V}$ ; (ii)  $\geq 20\text{V}$ ; (iii)  $\geq 25\text{V}$ ; (iv)  $\geq 30\text{V}$ ; (v)  $\geq 50\text{V}$ ; (vi)  $\geq 100\text{V}$ ; (vii)  $\geq 150\text{V}$ ; and (viii)  $\geq 200\text{V}$ , where " $\geq$ " stands for "greater than or equal to".

Preferably, operating the fragmentation means in the second mode comprises the step of supplying a voltage to the fragmentation means selected from the group comprising: (i)  $\leq 5\text{V}$ ; (ii)  $\leq 4.5\text{V}$ ; (iii)  $\leq 4\text{V}$ ; (iv)  $\leq 3.5\text{V}$ ; (v)  $\leq 3\text{V}$ ; (vi)  $\leq 2.5\text{V}$ ; (vii)  $\leq 2\text{V}$ ; (viii)  $\leq 1.5\text{V}$ ; (ix)  $\leq 1\text{V}$ ; (x)  $\leq 0.5\text{V}$ ; and (xi) substantially  $0\text{V}$ , where " $\leq$ " stands for "less than or equal to".

According to a seventh aspect of the present invention, there is provided a method of mass spectrometry as claimed in claim 59.

According to an eighth aspect of the present invention, there is provided a mass spectrometer as claimed in claim 60.

According a ninth aspect of the present invention, there is provided a m

mass spectrometers as claimed in claim 66.

According to a tenth aspect of the present invention, there is provided apparatus arranged and adapted to perform the method of any of claims 33-59.

Although it is preferred in the first embodiment (and optionally in the second embodiment) for the quadrupole mass filter to have initially a high pass characteristic, in less preferred embodiments the mass filter may have a bandpass characteristic. It is also contemplated in less preferred embodiments that the mass filter could have a "V-notched" transmission profile i.e. high transmission at low and high mass-to-charge ratios and preferably linearly or otherwise rapidly decreasing/increasing transmission either side of a mid-point.

The implementation of alternating low and high collision energy in both the first and second embodiments allows for (candidate) parent ions to be selected based on the occurrence of a specific daughter ion  $m/z$  value, either nominal or exact, in the high collision energy "MS survey" spectrum. According to the second embodiment, the selection criteria may also include selection based on the occurrence of ions with a specific difference in  $m/z$  value, either nominal or exact, between those in the low and high collision energy "MS survey" spectra.

Once one or more parent ions have been discovered, then according to both embodiments, a number of further criteria may be used for the further selection and/or rejection of candidate parent ions i.e. to refine the list of possible candidate parent ions down to a shortlist of more definite candidate parent ions. These criteria include:

- (a) selection based on required charge state (typically  $Z \geq 1$  for peptides,  $Z=1$  for drug metabolites);
- (b) selection based on relative or absolute intensity;
- (c) selection based on inclusion within a preferred  $m/z$  range;

- (d) selection based on list of preferred  $m/z$  values, either nominal or exact;
- (e) rejection based on list of excluded  $m/z$  values, either nominal or exact (typically known background ions or matrix related impurities);
- (f) rejection based on temporary (dynamic) list of excluded  $m/z$  values (typically precursor ions that have recently been analysed to prevent duplication).

According to the second embodiment and as a less preferred feature of the first embodiment, daughter ions formed by the fragmentation of multiply charged parent ions may be detected by the presence of ions having mass-to-charge ratios higher than the mass-to-charge ratios of candidate parent ions. This may be particularly appropriate when parent ions are generated by electrospray.

According to the first and second embodiment, in the event of multiple co-eluting components the true precursor ion may be discovered by using the first mass filter, MS1, to select each candidate precursor ion in turn to record its MS/MS fragment spectrum. However, the number of spectra to be acquired will only be increased by a number equal to just the number of candidate precursor ions. This is still much less than the many hundreds of spectra required by traditional parent ion scanning methods.

In the case of multiple co-eluting components there is scope for reducing the number of candidate precursor ions by the use of additional filtering criteria. For example, the targeted precursor ion may be discovered if the high collision energy spectrum is also interrogated for the presence of one or more characteristic neutral loss ions corresponding to each of the candidate precursor ions observed in the low collision energy spectrum. This may reduce the number of MS/MS fragment spectra to be recorded, in many cases to just one spectrum.

In principal, if the number of candidate precursor ions is four or more the number of MS/MS spectra to be acquired could be further reduced by repeatedly sub-dividing the candidate precursors in two equal or near equal sub-groups according to their mass. The high collision energy spectrum for all the precursor ions within each sub-group would then be recorded by setting the low-mass cut-off for MS1 to a  $m/z$  value dividing the two groups. By a process of elimination this procedure would allow arrival at the targeted precursor ion in less stages. In practice, this approach is preferred only when the number of candidate precursor ions is six or more. Nevertheless, to illustrate the potential value of this method, a mixture of 16 components may require 16 MS/MS spectra to discover the target precursor ion, whereas this approach could reduce the required number of MS/MS spectra to five.

Precursor ion discovery based on the presence of a specific product ion  $m/z$  value requires initial interrogation of only the high energy CID (Collision Induced Decomposition) "MS survey" spectra. If appropriate, the  $m/z$  transmission range of the quadrupole mass filter may be set such as not to transmit the  $m/z$  value of the specified product ion, thereby removing any background ions from the source at that  $m/z$  value. Any ions at the specified  $m/z$  value can only be product ions. When a daughter ion of interest elutes, the low energy CID "MS survey" spectrum now yields a short list of (candidate) parent ions. This list may optionally be further filtered or refined by various selection and/or rejection criteria, such as charge state, excluded  $m/z$  values, etc. Confirmation and identification of the targeted precursor ion now only requires acquisition of MS-MS spectra for the (optionally further filtered) short list of candidates. This achieves the same goal as traditional parent ion scanning without the need to scan the first mass filter, MS1, and with the added bonus of having acquired the full daughter ion spectrum of the targeted p

precursor ion. Specification of exact product ion  $m/z$  values further enhances selectivity.

Precursor Ion Discovery based on the presence of a specific neutral or ion loss requires interrogation of both the low and high energy CID "MS survey" spectra. The low energy spectra yield a short list of candidate precursor ions. Again this short list may be further filtered by various criteria, i.e. charge state, excluded  $m/z$  values, etc. A short list of  $m/z$  values with the specified neutral or ion loss may now be generated.

These  $m/z$  values are now searched against the high energy CID "MS survey" spectrum. The precursor ion for any hits may be confirmed and identified by acquisition of its MS-MS spectrum. This achieves the same goal as traditional neutral loss scanning without the need to scan MS1 and MS2, and again with the added bonus of having acquired the full product ion spectrum of the targeted precursor ion. Again exact  $m/z$  values may be specified.

The various preferred embodiments provide numerous advantages over conventional techniques of parent ion scanning, including the possibility of discovering the mass-to-charge ratios of parent ions and to obtain their corresponding daughter ion spectra within on-line time scales e.g. chromatography time scales. The preferred embodiments also have higher sensitivities than conventional parent ion scanning methods, and open up the possibility of incorporating multiple criteria into the same experiment for selection of parent ion  $m/z$  values. It is also possible to discover multiple classes of parent ion within the same experiment and the methods can be used with mass tagging.

A preferred embodiment will now be described with reference to Fig. 1.

A mass spectrometer 6 comprises an ion source 1, preferably an electrospray ionization source, an optional ion guide 2, a first quadrupole mass

filter 3, a collision cell 4 and an orthogonal acceleration time-of-flight mass analyser incorporating a reflectron 5. The mass spectrometer 6 may be interfaced with a chromatograph, such as a liquid chromatograph (not shown), so that the sample entering the ion source 1 may be taken from the eluent of the liquid chromatograph.

The quadrupole mass filter 3 is disposed in an evacuated chamber which is maintained at a relatively low pressure e.g. less than  $10^{-5}$  mbar. The electrodes comprising the mass filter 3 are connected to a power supply which generates both RF and DC potentials which determine the range of mass-to-charge values that are transmitted by the filter 3. A fragmentation means 4, preferably a collision cell, is disposed to receive ions which are transmitted by the mass filter 3. In particularly preferred embodiments the collision cell may comprise a quadrupole or hexapole rod set which may be enclosed by a substantially gas-tight casing into which a collision gas, in use, such as helium, argon, nitrogen, air or methane may be introduced at a pressure of between  $10^{-4}$  and  $10^{-1}$  mbar, further preferably  $10^{-3}$  mbar to  $10^{-2}$  mbar. Suitable RF potentials for the electrodes comprising the fragmentation means 4 are provided by a power supply (not shown).

Ions generated by the ion source 1 pass through the ion guide 2 into the mass filter 3 and into the fragmentation means 4. Ions exiting from the fragmentation means 4 pass into a time-of-flight mass analyser 5. Other ion optical components, such as ion guides or electrostatic lenses, may be present which are not shown in the figures or described herein to maximise ion transmission between various parts of the apparatus. Various vacuum pumps (not shown) may be provided for maintaining optimal vacuum conditions in the device. The time-of-flight mass analyser 5 operates in a known way by measuring the transit time of the ions comprised in a packet of ions so that their mass-to-charge ratios can be determined.

A control means (not shown) provides control signals for the various power supplies (not shown) which respectively provide the necessary operating potentials for the ion source 1, ion guide 2, quadrupole mass filter 3, fragmentation means 4 and the time-of-flight mass analyser 5. These control signals determine the operating parameters of the instrument, for example the mass-to-charge ratios transmitted through the mass filter 3 and the operation of the analyser 5. The control means is typically controlled by signals from a computer (not shown) which may also be used to process the mass spectral data acquired. The computer can also display and store mass spectra produced from the analyser 5 and receive and process commands from an operator. The control means may be automatically set to perform various methods and make various determinations without operator intervention, or may optionally require operator input at various stages.

Figs. 2(a) and 2(b) show respectively daughter and parent ion spectra of a tryptic digest of ADH known as alcohol dehydrogenase. The daughter ion spectrum shown in Fig. 2(a) was obtained while the collision cell voltage (i.e. the voltage applied to fragmentation means 4) was high, e.g. 30V, which resulted in significant fragmentation of ions passing therethrough. The parent ion spectrum shown in Fig. 2(b) was obtained at low collision energy e.g. less than or equal to 5V. The mass spectra in this particular example were obtained from a sample eluting from a liquid chromatograph, and the spectra were obtained sufficiently rapidly and close together in time that they correspond to substantially the same component or components eluting from the liquid chromatograph.

According to both embodiments of the present invention, it may be determined that a predetermined daughter ion of interest say, for example, daughter ions having a  $m/z$  value of 136.1099 as shown in Fig. 2(a) are present. This determination may be made either by an operator or by automatic

ic determination using a computer. According to the first embodiment once this determination has been made, then the voltage applied to the collision cell is set to low and a parent ion spectrum (corresponding to Fig. 2(b)) is acquired.

In both embodiments, the parent ion spectrum may then be analysed so as to determine which peaks correspond to candidate parent ions. In Fig. 2(b), there are several high intensity peaks in the parent ion spectrum, e.g. the peaks at 418.7724 and 568.7813, which are not substantially present in the corresponding daughter ion spectrum. These peaks may therefore preferably be considered to indicate candidate parent ions.

According to both embodiments, once a predetermined daughter ion of interest has been detected, for example, ions having a  $m/z$  value of 136.1099, and corresponding candidate parent ion(s) have been identified, e.g. ions having  $m/z$  values of 418.7724 and 568.7813, then the mass filter 3 is set to operate as a narrow band pass filter so as to substantially transmit to the fragmentation means 4 only one of the candidate parent ions, for example, ions having a  $m/z$  value of 418.7224. The fragmentation means 4 is set at high collision energy, so that a full daughter spectrum for that particular candidate parent ion may be obtained. If the predetermined daughter ion of interest is present in the full daughter spectrum, then it must be a product of the selected candidate parent ion. If the predetermined daughter ion is not present then another candidate parent ion is selected.

Even if a daughter ion scan is required to be run for all candidate parent ion peaks, much fewer scans are required than in the conventional methods of parent ion scanning.

Variables which may be taken into account in determining whether particular peaks are significant may include e.g. the intensity of the observed peak or the charge state of the ion (which may be deduced by a variety

of known methods). Ions may also be excluded from consideration based on certain criteria.

In relation to both embodiments of the present invention, it may be appropriate to search for candidate parent ions by interrogating the daughter ion spectrum for more than one characteristic daughter ion. According to the second embodiment of the present invention, candidate parent ions may be searched for on the basis of a combination of daughter ions and the loss of predetermined ions or neutral particles from a parent ion. This may be particularly relevant when the parent ions have been "tagged" with a specific mass tag. A mixture of two or more parent ions may be tagged each with a different mass tag which could be discovered by simultaneously monitoring for two or more characteristic daughter ions.

Hence, parent ions from two or more different classes of compounds could be discovered in the same set of experiments.

According to the second embodiment spectra may be continuously acquired at different collision voltages. A particularly preferred arrangement is to acquire spectra alternately at relatively high and low collision voltages. When the method is used to analyse the output of an on-line process such as liquid chromatography, this method is particularly useful as alternate spectra correspond to substantially the same composition of sample eluting from the chromatograph.

A number of examples will now be given to further illustrate various aspects of preferred embodiments of the present invention.

#### Example 1 - Neutral loss

The huge increase in genomic sequence information available, combined with the increased sensitivity and selectivity provided by mass spectrometry has allowed large-scale protein identification. The analysis of the

post-translational modifications present on the identified proteins is, however, a more challenging problem. Currently the approach that offers the most specific solution, via mass spectrometry, is precursor ion scanning. When performing a precursor ion scanning experiment the mass spectrometer searches for all ions that fragment to produce a common diagnostic product ion. A typical application would be to scan through a protein digest mixture searching only for those peptides that are potentially phosphorylated. Current methods of performing precursor ion experiments on a known mass spectrometer (Q-TOF 2 available from Micromass) having a first quadrupole mass filter (MS1), a quadrupole collision cell and an orthogonal time of flight mass analyser (MS2) involve scanning the quadrupole of the instrument, MS1, over the  $m/z$  range in which precursors are sought, whilst recording a full product ion spectrum with the time of flight analyser. This approach can, however, limit the sensitivity of the precursor ion experiment due to the relatively low duty cycle of a scanning quadrupole.

An experimental methodology that allows specific post translationally modified peptides to be identified and sequenced during the course of an HPLC experiment on the known mass spectrometer will now be described. During this experiment the quadrupole was operated in wideband mode.

The samples were introduced to the mass spectrometer by means of a Micromass modular CapLC system. Samples were loaded onto a C18 cartridge (0.3 mm x 5 mm) and desalted with 0.1% HCOOH for 3 minutes at a flow rate of 30  $\mu$ L per minute (Fig. 3). The ten port valve was then switched such that the peptides were eluted onto the analytical column for separation, see insert Fig. 3. The flow from pumps A and B were split to produce a flow rate through the column of approximately 200 nL/min.

The analytical column used was a PiccoFrit<sup>TM</sup> ([www.ncwebjjective.com](http://www.ncwebjjective.com)) column packed with Waters Symmetry C18 ([www.waters.com](http://www.waters.com)). This was set up to

spray directly into the mass spectrometer. The electrospray potential (ca. 3kV) was applied to the liquid via a low dead volume stainless steel union. A small amount (ca. 5 psi) of nebulising gas was introduced around the spray tip to aid the electrospray process.

All data were acquired using a Q-TOF2 quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight hybrid mass spectrometer ([www.micromass.co.uk](http://www.micromass.co.uk)), fitted with a Z-spray nanoflow electrospray ion source. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode with a source temperature of 80°C and a cone gas flow rate of 40L/hr.

The instrument was calibrated with a multi-point calibration using selected fragment ions that resulted from the collision-induced decomposition (CID) of Glu-fibrinopeptide b. All data were processed using the MassLynx suite of software.

During the HPLC gradient the instrument was operated in the MS mode and switched alternately at one-second intervals between low and high collision energy with argon in the collision cell. The quadrupole, MS1, was operated in the rf only mode allowing the full mass range to be passed to the time of flight analyser. The first data set at low energy (4 eV) shows only the normal pseudo molecular ions. The second at higher energy also contains their product ions (see Fig. 4). Whenever a product ion of interest occurred in the high-energy data, all its possible precursors were present in the corresponding low energy data. The mass spectrometer was then switched to a MS/MS mode sequentially selecting the potential precursors to reveal the true parent.

In the case of phosphopeptides, both phosphoserine and phosphothreonine containing precursors may be identified as they display a neutral loss of 98 Da ( $H_3PO_4$ ) under high-energy conditions. Correspondingly, the software may make a list of neutral losses from the precursors identified in the low energy spectrum. This involves measuring the masses of the pre

cursor ions, determining their charge states and subtracting the neutral loss i.e. 97.9769 (1+), 49.9885 (2+). Appearance of the neutral loss in the high energy spectrum causes the instrument to switch into the product ion mode to confirm the neutral loss and to acquire additional sequence information. The exact mass capability of the Q-TOF2 increases the specificity of the neutral loss particularly in the case of a mass deficient loss such as that observed with phosphate. Fig. 5 shows a schematic of an exact neutral loss experiment.

Fig. 6 shows the results of an exact neutral loss experiment performed on a 100fm (femtomole) of an alpha casein digest loaded on column. As can be seen from the MS/MS chromatogram the instrument switched to the product ion mode twice during the experiment, suggesting that the 830.02 (2+) and 976.46 (2-) ions have exhibited a neutral loss.

Fig. 7 shows the low and high-energy spectra at the time of elution for the 976.46 (2+) ion. The low energy spectrum contains a minimum of eight multiply charged ions. The high energy spectrum shows the complicated mixture of fragment ions derived from the eight peptides. An expanded view of  $m/z$  910-995 is shown in Fig. 8 and reveals that the peptide at 976.46 (2+) has fragmented to produce an ion which is assigned as a neutral loss within the accurate mass window of  $\pm 20$  mDa (milli Dalton). All other product ions in the spectrum have not met the criteria to be assigned as a neutral loss.

Having registered the 976.46 (2+) ion as having undergone a neutral loss, the instrument then switches into a MS/MS mode. This confirms that the ion assigned as the neutral loss has arisen from the 976.46 (2-) ion and is not a coincidental fragment ion produced from one of the other peptides present in the source (see Fig. 9). The product ion spectrum also provides sequence information from the phosphorylated peptide (see Fig. 10).

Fig. 11 shows the neutral loss of  $H_3PO_4$  from a beta casein digest peptide detected at a concentration of 10fm (femimole) injected on column. In the case of phosphotyrosine, fragmentation to produce a neutral loss of  $H_3PO_4$  does not occur. It does, however, decompose to produce a phosphorylated immonium ion at  $m/z$  216 in positive ESI. The software can be directed to monitor for this ion, switching to a MS/MS mode when it appears in the high-energy spectrum.

#### Example 2 - Automated discovery of a peptide containing the amino acid Asparagine

The total ion chromatogram for the HPLC separation and mass analysis of the tryptic digest of the protein ADH (Alcohol Dehydrogenase) is shown in Fig. 12. This chromatogram was extracted from all the low energy spectra recorded on the Q-TOF tandem MS/MS system. For this data, the Q-TOF was operating in the MS mode and alternating between low and high collision energy in the gas collision cell for successive spectra.

Fig. 13 shows the mass chromatogram for  $m/z$  87.04 extracted from the same HPLC separation and mass analysis as described in relation to Fig. 12 above. The immonium ion for the amino acid Asparagine has a  $m/z$  value of 87.04. This chromatogram was extracted from all the high energy spectra recorded on the Q-TOF.

Fig. 14 shows the full mass spectrum corresponding to scan number 604. This was a low energy mass spectrum recorded on the Q-TOF, and is the low energy spectrum next to the high energy spectrum at scan 605 that corresponds to the largest peak in the mass chromatogram of  $m/z$  84.04. This shows that the parent ion for the Asparagine immonium ion at  $m/z$  87.04 has a mass of 1012.54 since it shows the singly charged  $(M+H)^+$  ion at  $m/z$  1013.54, and the doubly charged  $(M-2H)^{2+}$  ion at  $m/z$  507.27.

Example 3 - Automated discovery of phosphorylation of a protein by neutral loss

Fig. 15 shows a mass spectrum from the low energy spectra recorded on a Q-TOF tandem MS/MS system of a tryptic digest of the protein  $\beta$ -Caesin.

The protein digest products were separated by HPLC and mass analysed.

The mass spectra were recorded on the Q-TOF operating in the MS mode and alternating between low and high collision energy in the gas collision cell for successive spectra.

Fig. 16 shows the mass spectrum from the high energy spectra recorded during the same period of the HPLC separation as that in Fig. 15 above.

Fig. 17 shows a processed and expanded view of the same spectrum as in Fig. 16 above. For this spectrum, the continuum data has been processed such to identify peaks and display as lines with heights proportional to the peak area, and annotated with masses corresponding to their centroided masses. The peak at  $m/z$  1031.4395 is the doubly charged  $(M-2H)^{++}$  ion of a peptide, and the peak at  $m/z$  982.4515 is a doubly charged fragment ion. It has to be a fragment ion since it is not present in the low energy spectrum. The mass difference between these ions is 48.9880. The theoretical mass for  $H_3PO_4$  is 97.9769, and the  $m/z$  value for the doubly charged  $H_3PO_4^{++}$  ion is 48.9884, a difference of only 8 ppm from that observed.

Example 4 - Discovery of a parent ion of a phosphorylated peptide by recognition of a characteristic neutral loss

A Q-TOF2 mass spectrometer was set up to acquire mass spectra, with collision gas in the collision cell, and with the acquisition set to acquire alternate high and low energy spectra. When a daughter ion, with a mas

s difference from a candidate parent ion corresponding to the loss of the  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ion, was identified the system would automatically switch to acquire the MS/MS spectrum of that candidate parent ion.

The following is an example of such an acquisition. The protein  $\alpha$ -casein was digested, and 100 fmol (femtomole) of the digest was injected for separation by liquid chromatography before spraying into the electrospray source of the Q-TOF2.

Fig. 18 shows from bottom to top the following chromatograms: (1) the TIC (total ion current) chromatogram for the low energy MS mode; (2) the TIC chromatogram for the high energy MS mode; and (3) the TIC chromatogram for the MS/MS mode.

The chromatogram peaks eluting at 20.9, 23.5 and 25.5 minutes are chopped in the chromatograms displayed in traces (1) and (2). This is because for these three peaks the system switched into the MS/MS mode part way through the elution of the peaks. This is indicated in trace (3), which shows the times at which MS/MS spectra were acquired.

Fig. 19 shows from bottom to top the following mass spectra: (1) the low energy mass spectrum at 25.335 minutes into the run; (2) the high energy mass spectrum at 25.315 minutes into the run; and (3) the full MS/MS spectrum for  $m/z$  range 976-978 at 25.478 minutes into the run.

The spectrum in trace (1) shows the low energy mass spectrum at time 25.335 minutes. It mainly shows the doubly charged ion ( $m/z$  976.4) and the triply charged ion ( $m/z$  651.6) for a peptide with a mass of 1952 Daltons. The spectrum in trace (2) shows the high-energy spectrum at time 25.315 minutes, and shows a new peak at  $m/z$  927 (not labelled). This has to be a daughter ion, since it is not present in the low energy spectrum, and it has a difference in  $m/z$  of 49 from the parent ion at  $m/z$  976. This mass corresponds to that of the doubly charged  $\text{H}_3\text{PO}_4^{++}$  ion. The system has automatically recognised this mass difference and switched to re

cord the MS/MS spectrum from the  $m/z$  range 976-978. The MS/MS spectrum confirms that the peak at  $m/z$  927, corresponding to the loss of the doubly charged  $H_3PO_4^{2+}$  ion, is from that parent ion at  $m/z$  976. It also shows other fragment ions from that parent ion, thereby allowing confirmation of the identity of the peptide.

#### 4 BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

Fig. 1 is a schematic drawing of a preferred arrangement;

Figs. 2(a) and 2(b) respectively show typical daughter ion and parent ion spectra;

Fig. 3 shows a schematic of a valve switching arrangement during sample loading and desalting. Inset shows desorption of a sample from an analytical column;

Fig. 4 shows a Q-TOF2 mass spectrometer switching, preferably, at one second intervals, between low and high collision energy with argon gas in the collision cell. The low energy data set shows the pseudo molecular ions, and the high energy data set also shows their fragment ions;

Fig. 5 shows a flow chart of an exact neutral loss experiment;

Fig. 6 shows results of an exact neutral loss experiment on 100fm of an alpha casein digest loaded onto a column;

Fig. 7 shows low and high energy spectra at the time of elution of the 976.46 (2+) ion shown in Fig. 6;

Fig. 8 shows an expanded view of low and high-energy spectra for  $m/z$  910-995;

Fig. 9 shows confirmation of the neutral loss from 976.46 (2+) in product ion mode;

Fig. 10 shows an annotated product ion spectrum of 976.46 (2+);

Fig. 11 shows neutral loss of  $H_3PO_4$  from a digest peptide of beta casein at 10fm injected on column;

Fig. 12 shows a total ion chromatogram of a ADH tryptic digest;

Fig. 13 shows a mass chromatogram of 87.04 (Asparagine, immonium ion);

Fig. 14 shows a fragment T5 from ADH sequence ANELLINVK MW 1012.59;

Fig. 15 shows a mass spectrum for the low energy spectra of a tryptic digest of  $\beta$ -Casein;

Fig. 16 shows a mass spectrum for the high energy spectra of a tryptic digest of  $\beta$ -Casein;

Fig. 17 shows a processed and expanded view of the same spectrum as in Fig. 16;

Fig. 18 shows chromatograms for  $\alpha$ -casein; and

Fig. 19 shows mass spectra for  $\alpha$ -casein.

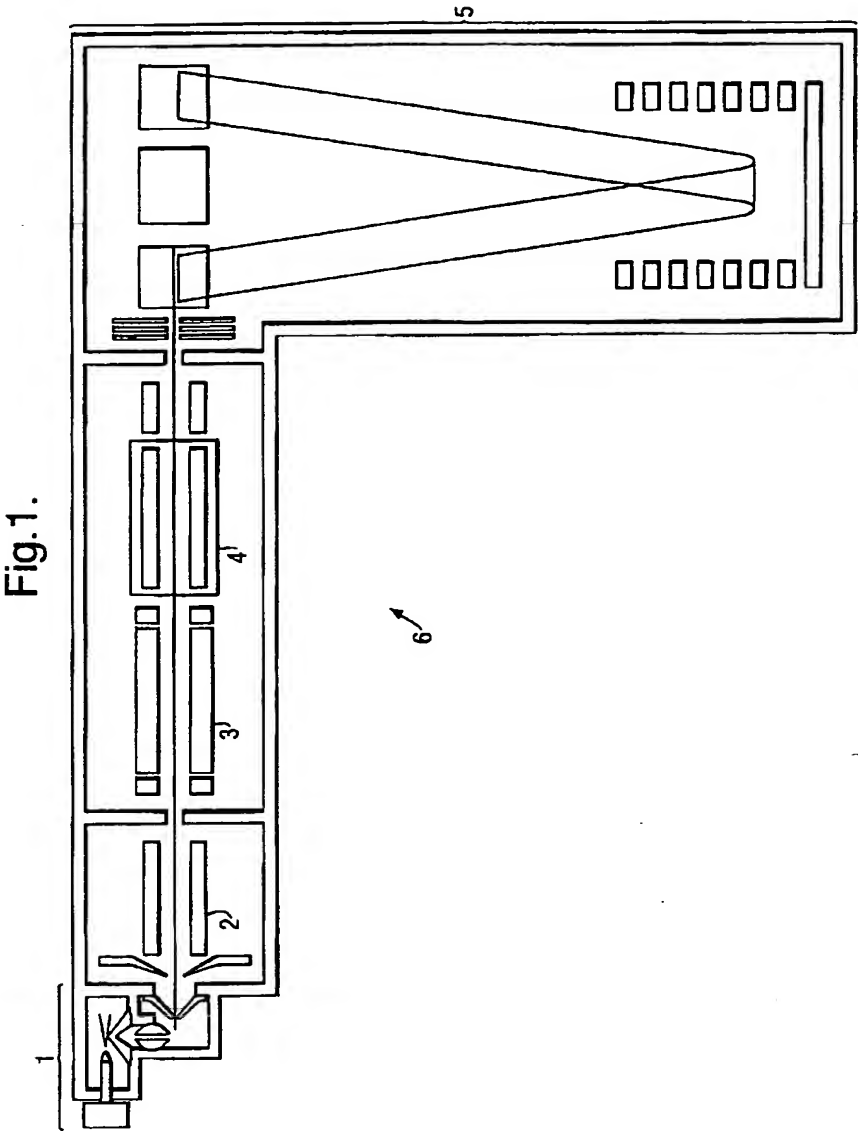


Fig.2(a).

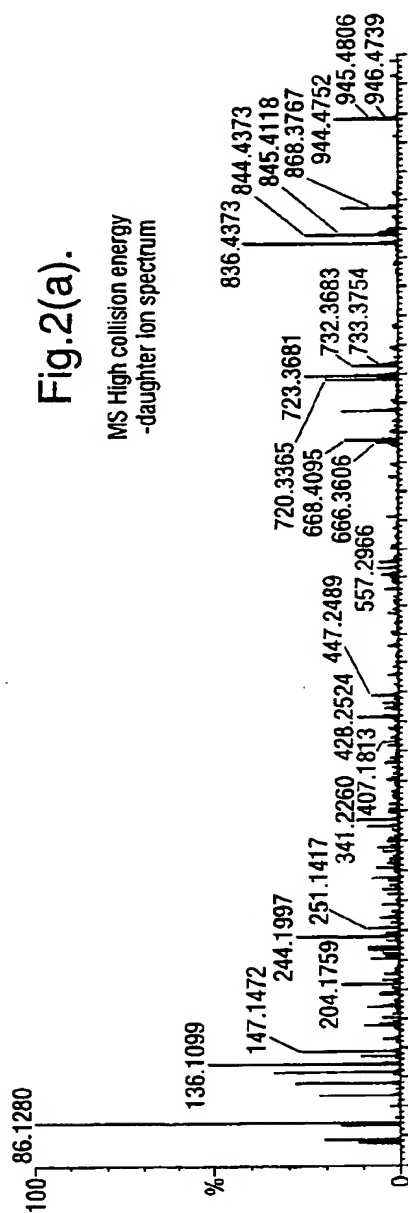
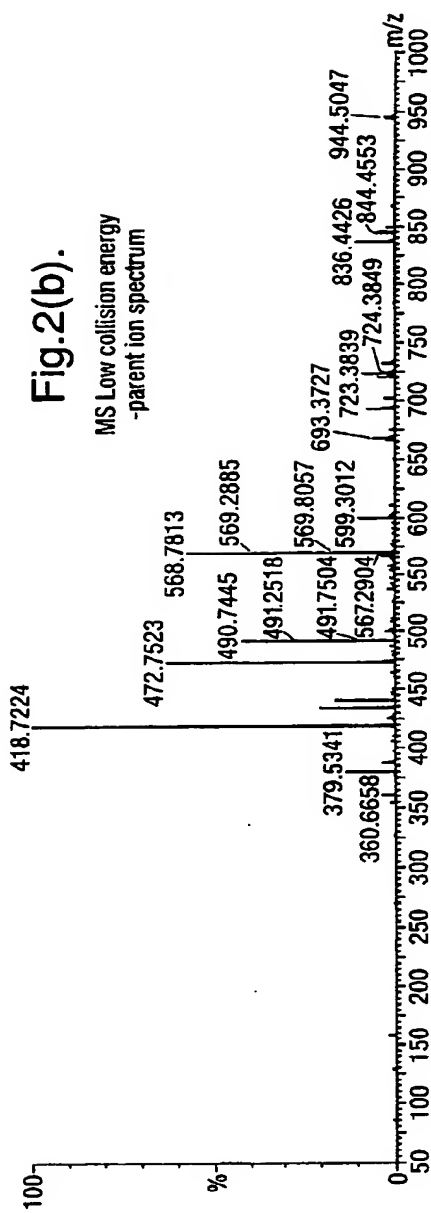


Fig.2(b).



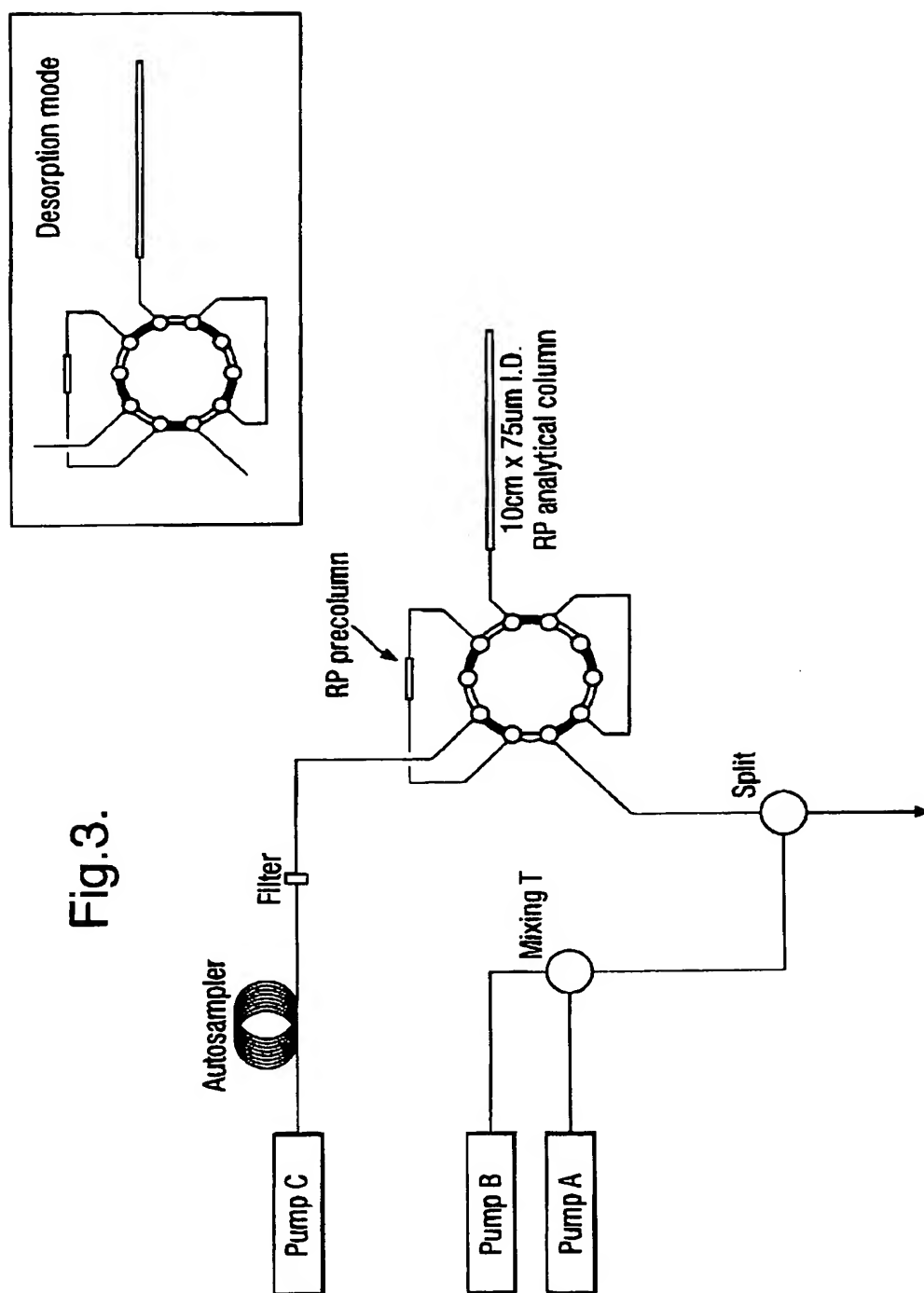


Fig.4.

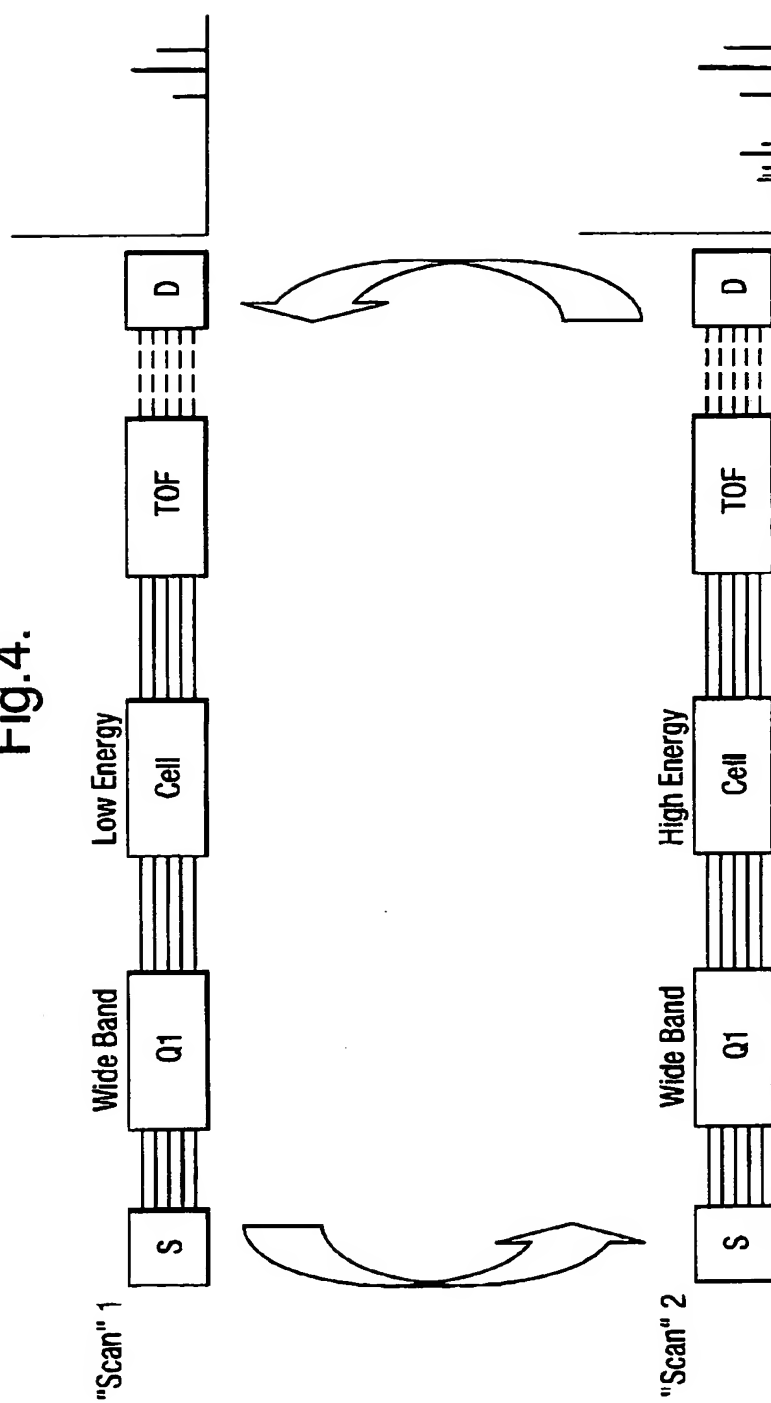
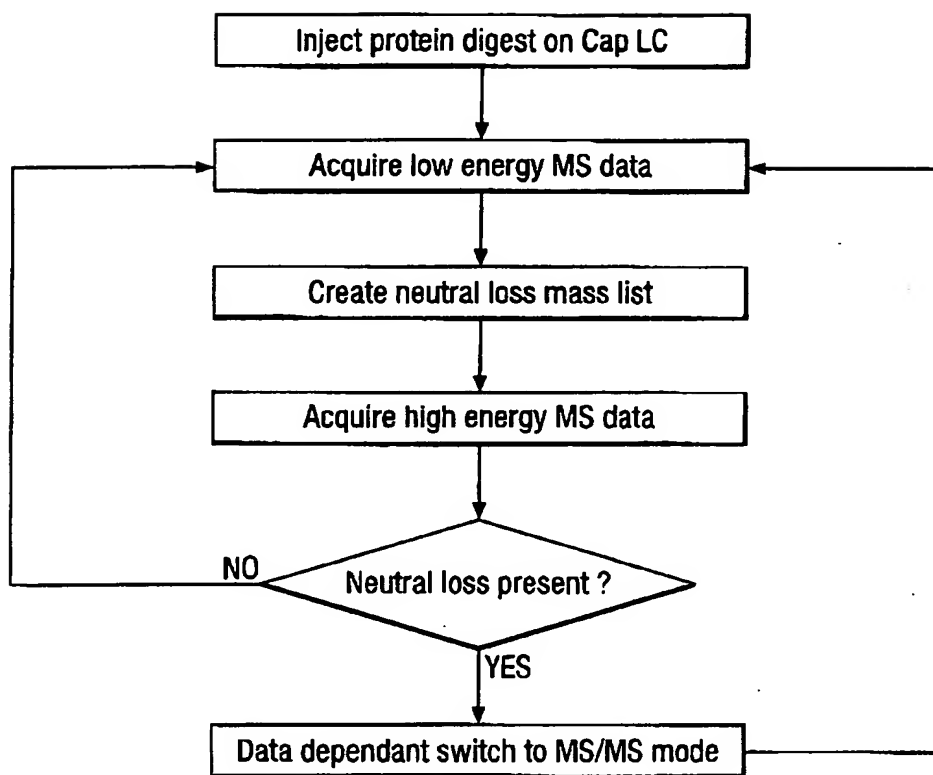


Fig.5.



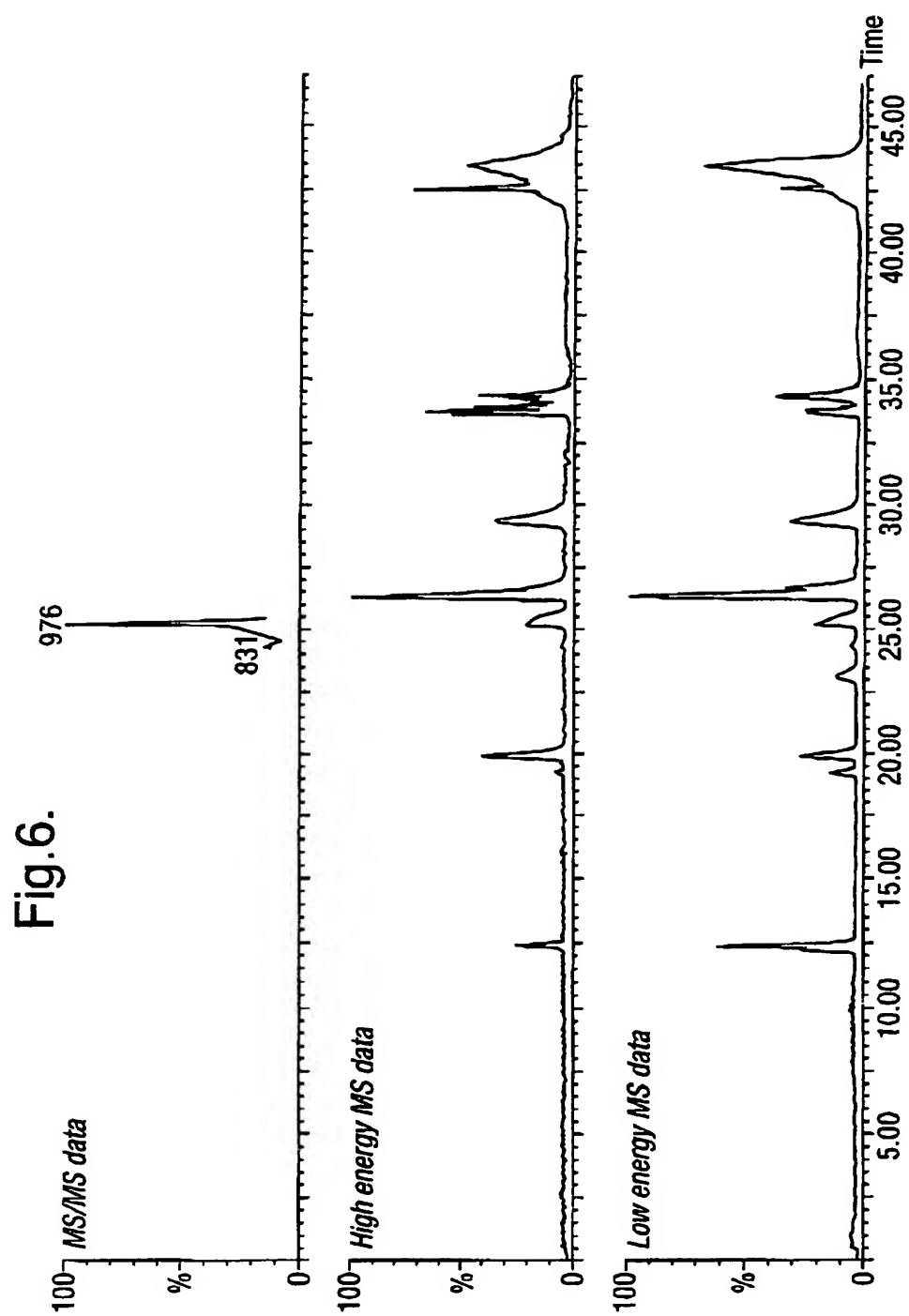


Fig.7.

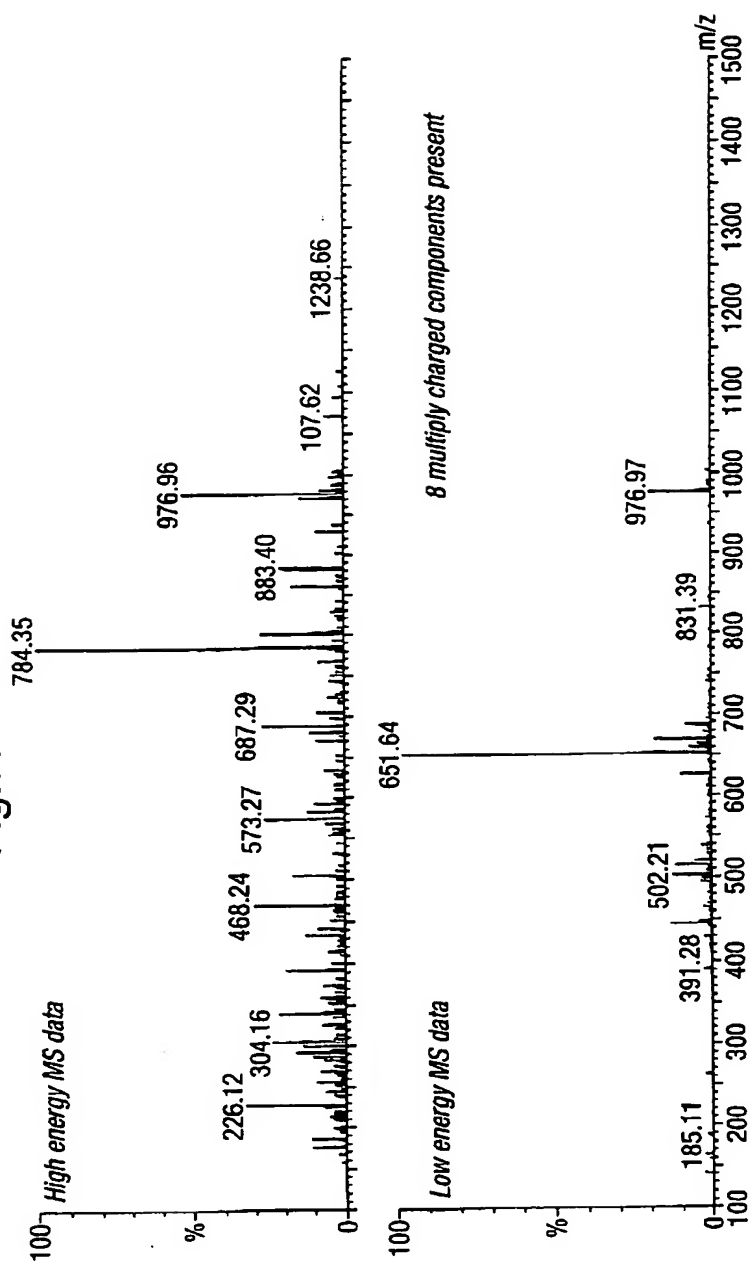
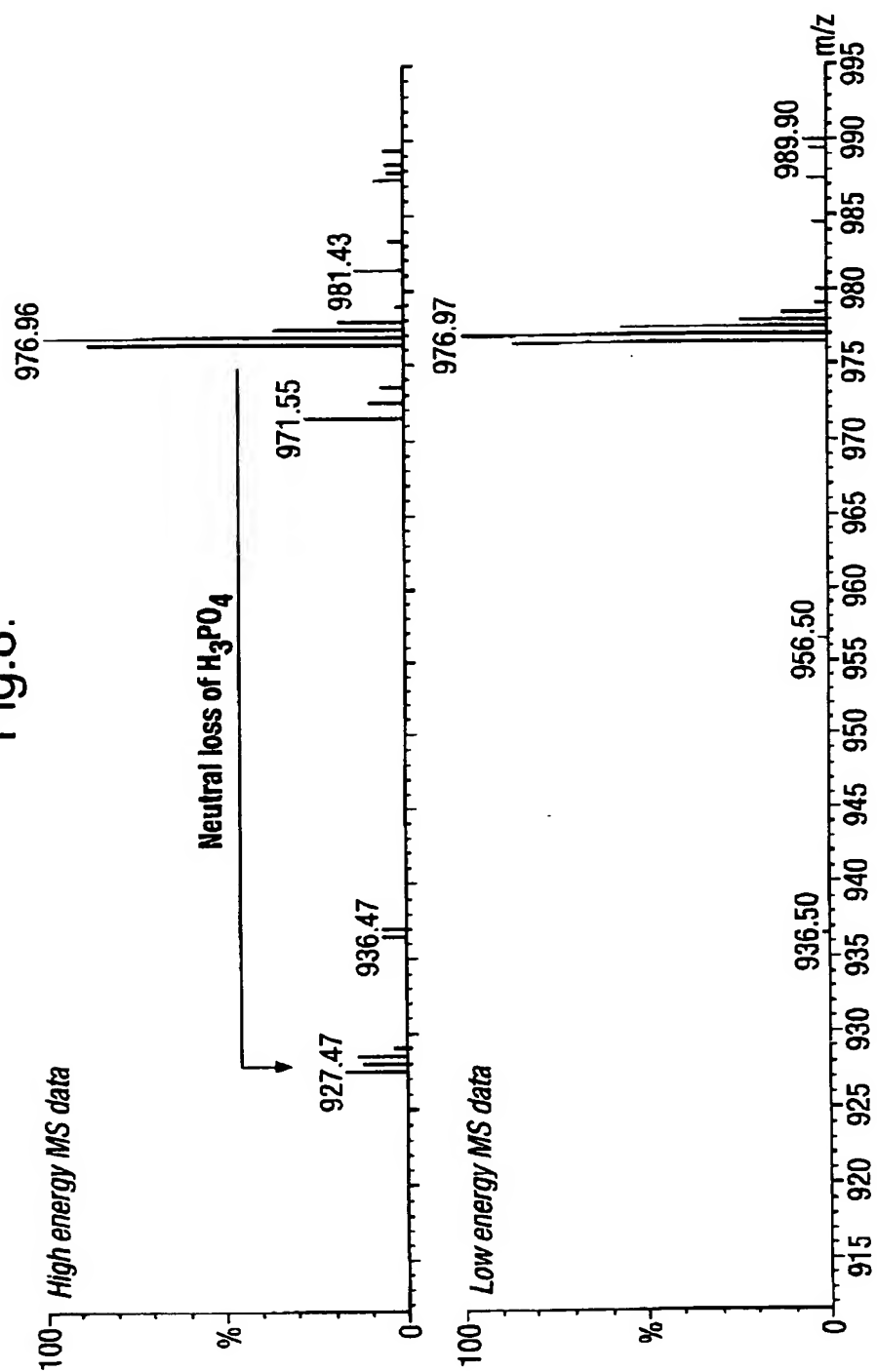


Fig.8.



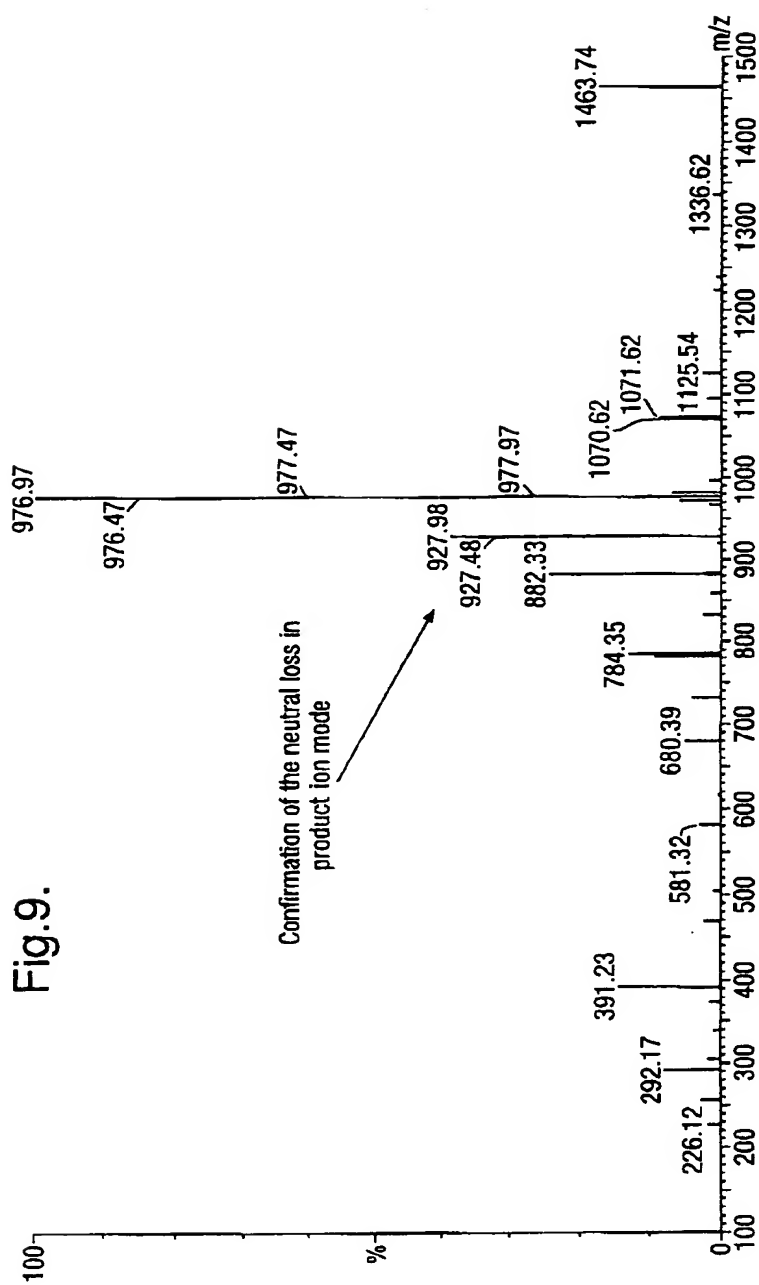
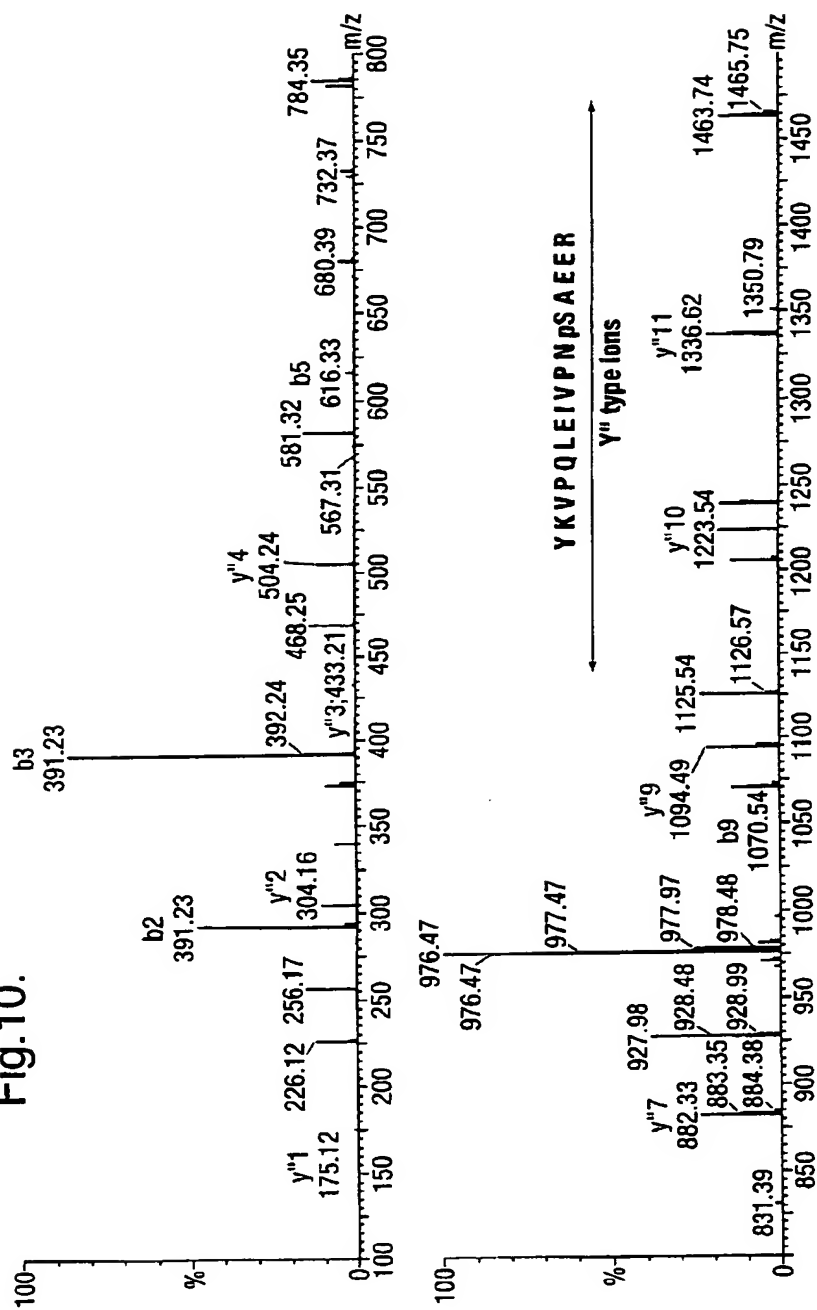
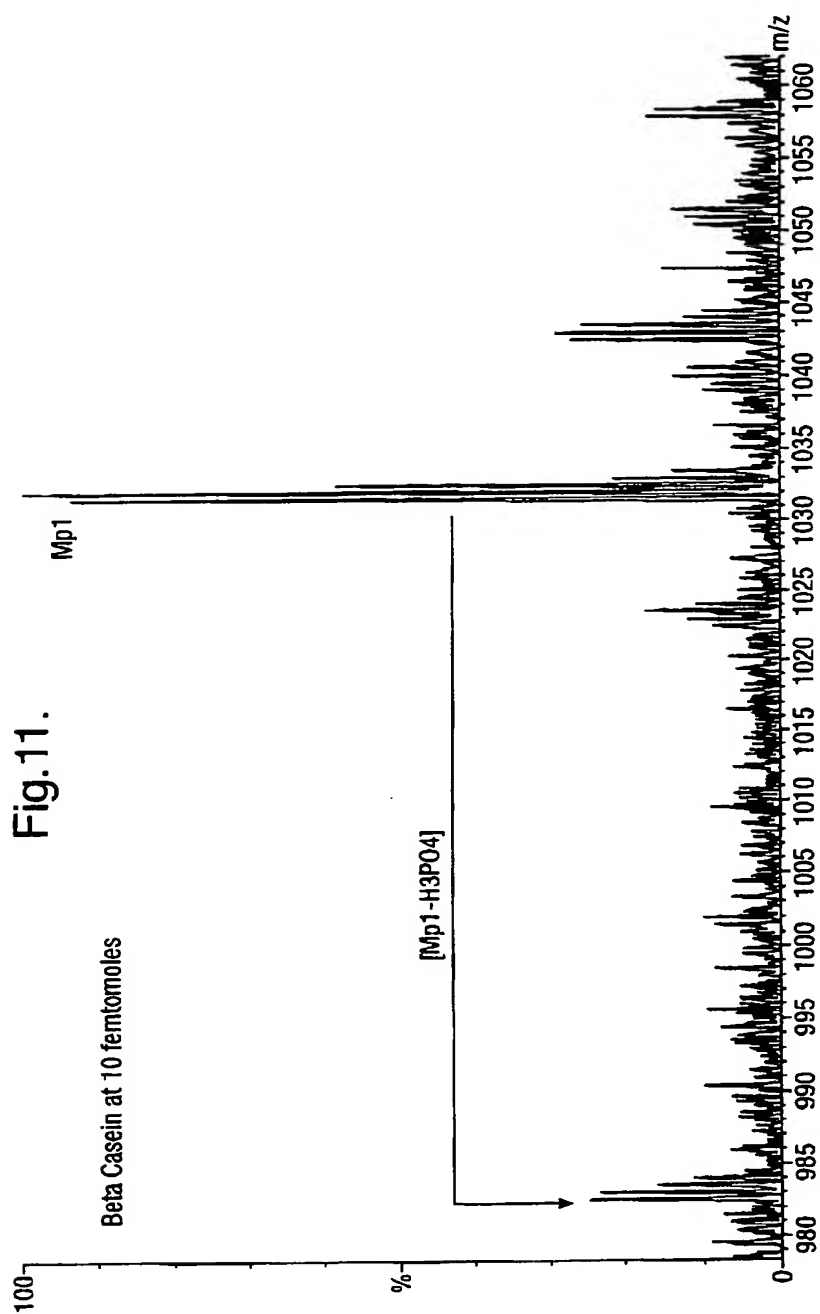


Fig.10.





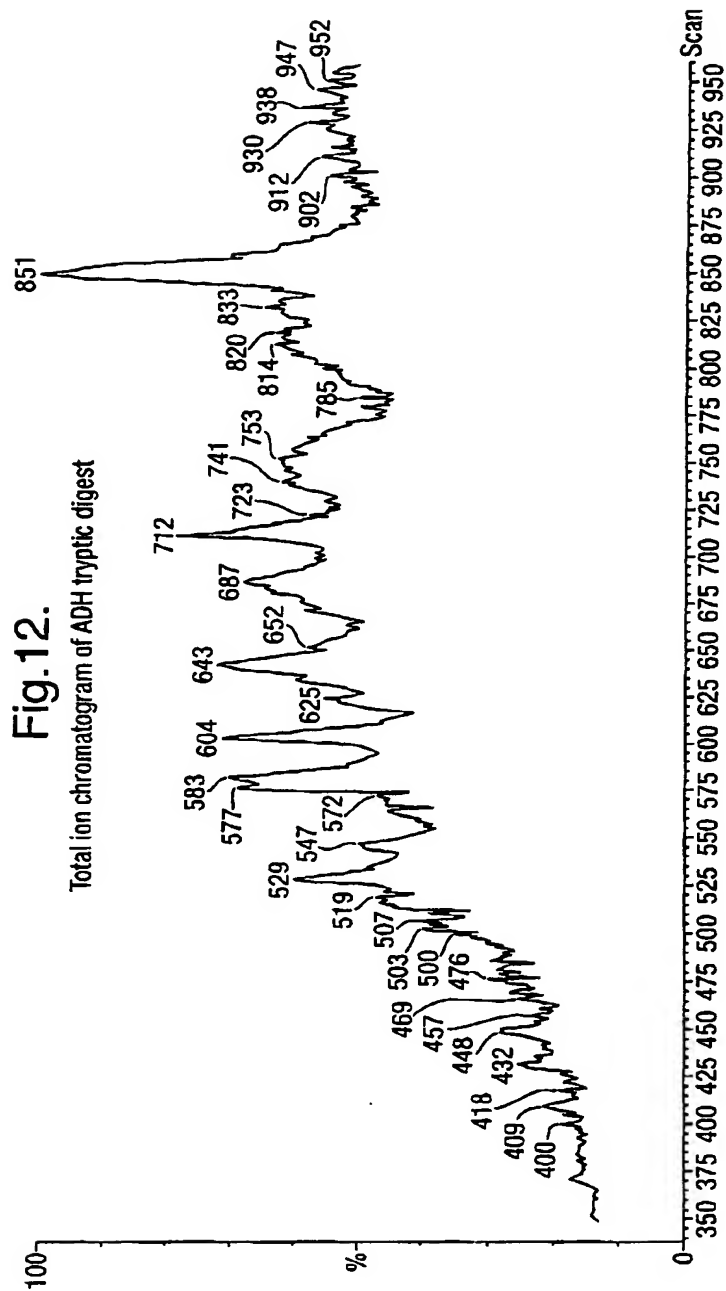


Fig.13.

Mass chromatogram of 87.04 (Asparagine immonium ion)

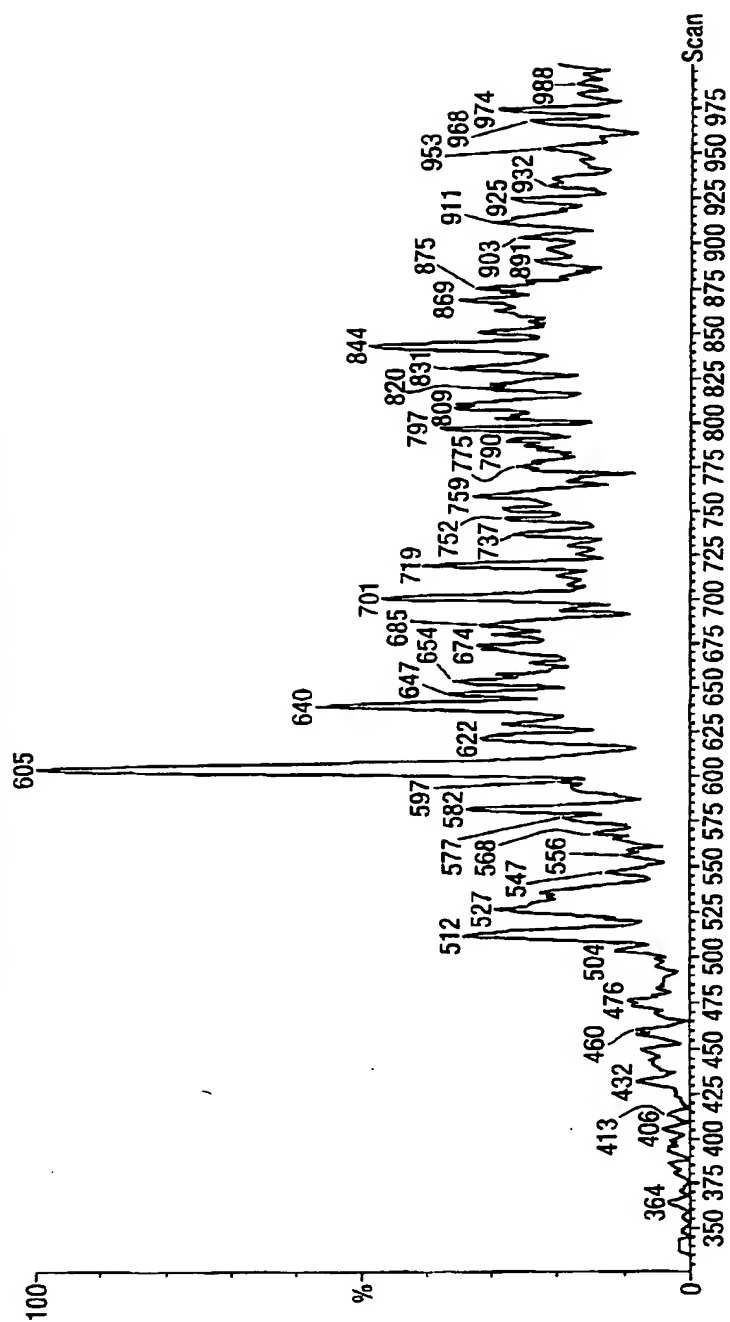
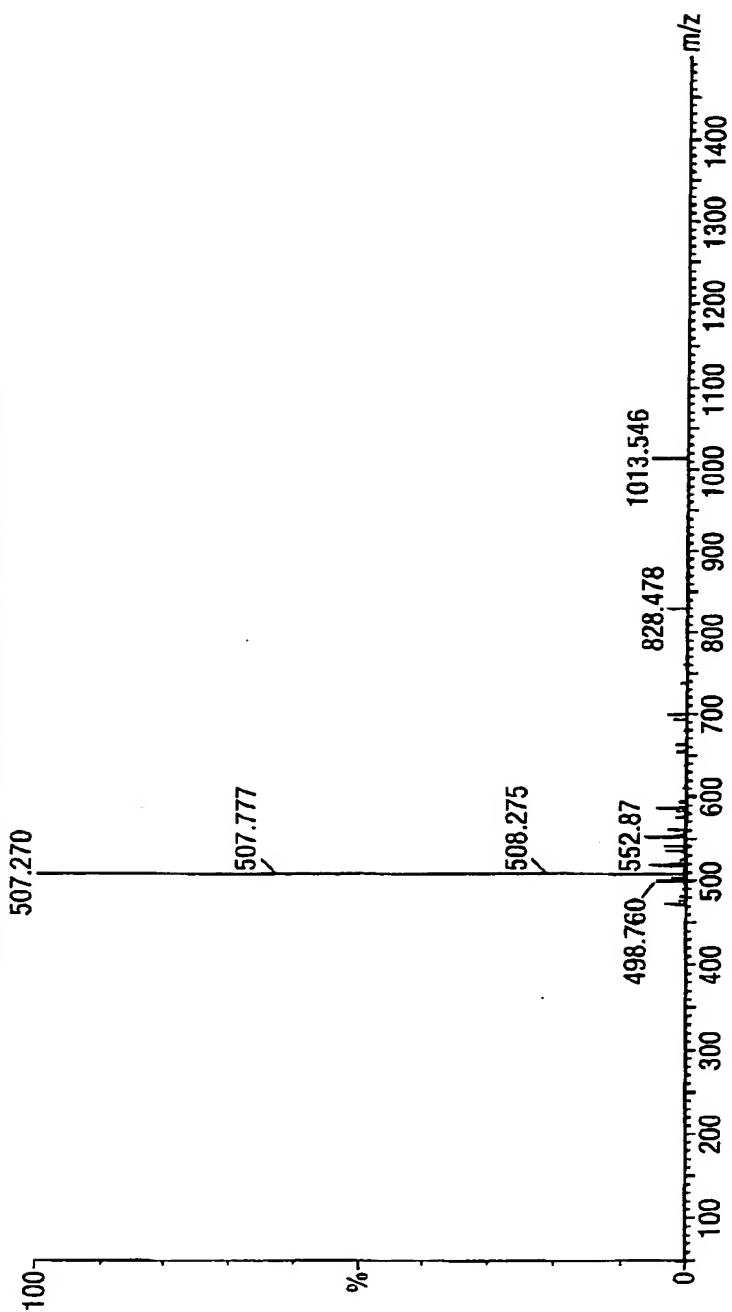


Fig.14.

Fragment T5 from ADH Sequence ANELLINVK MW 1012.59



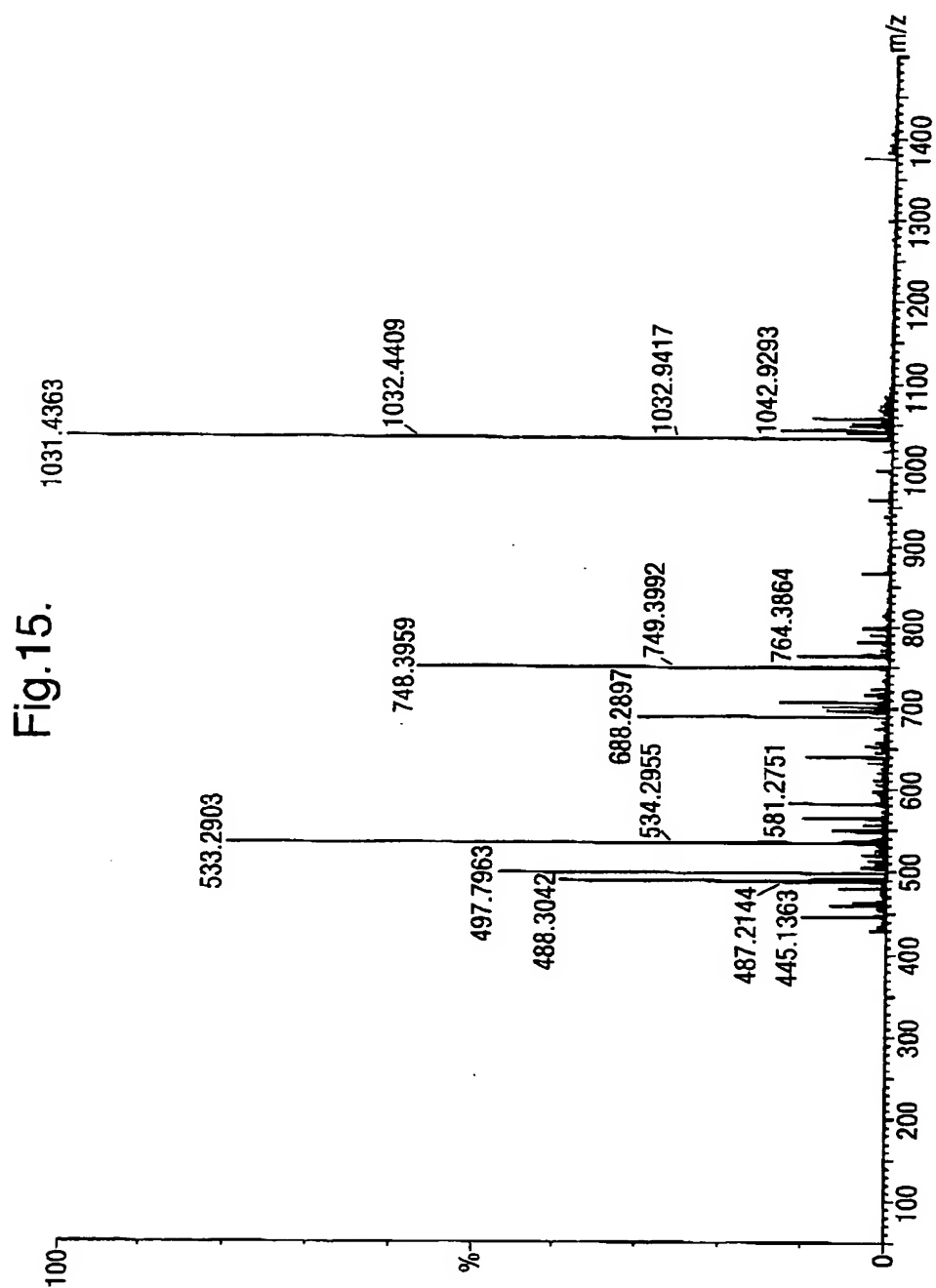
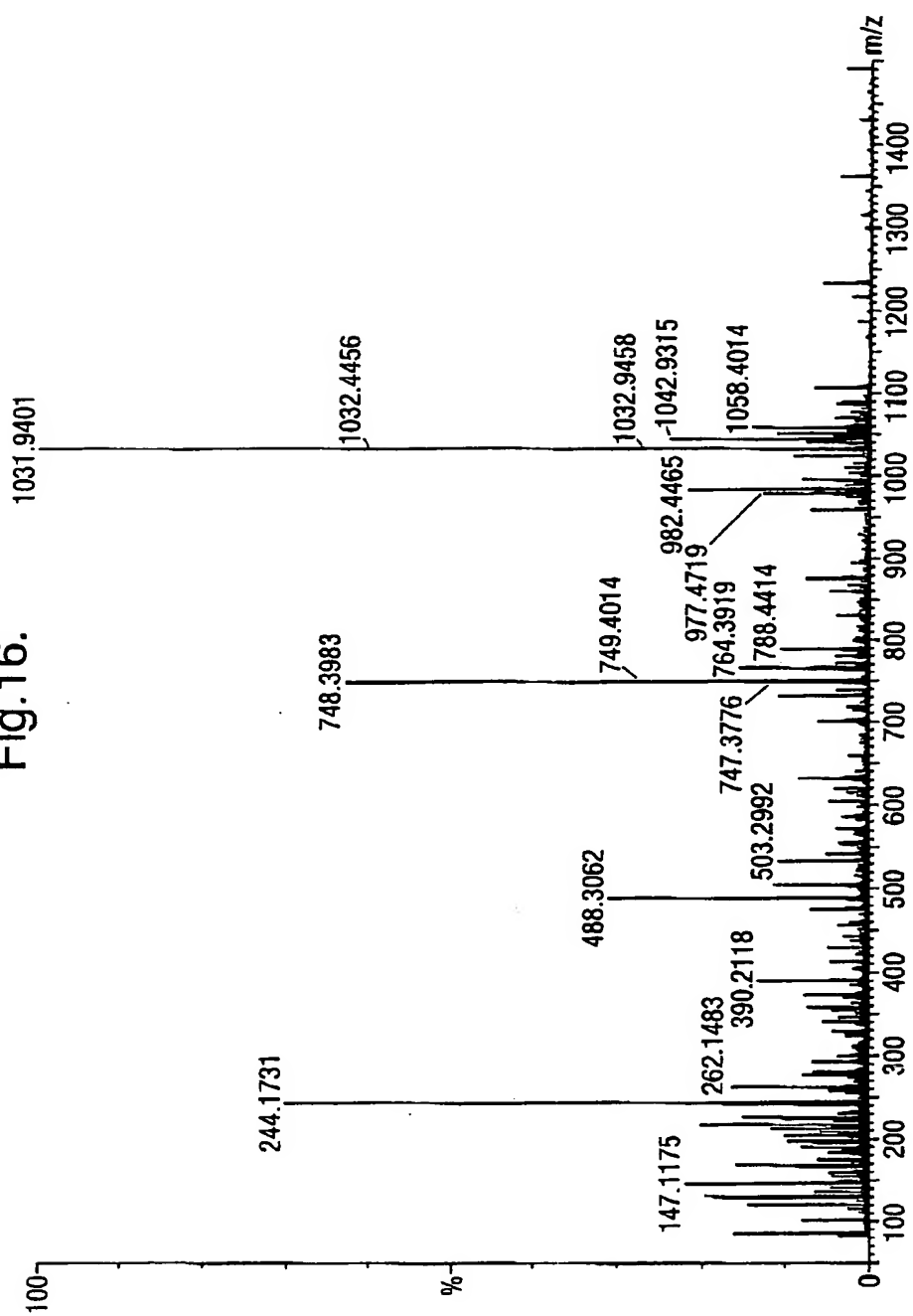
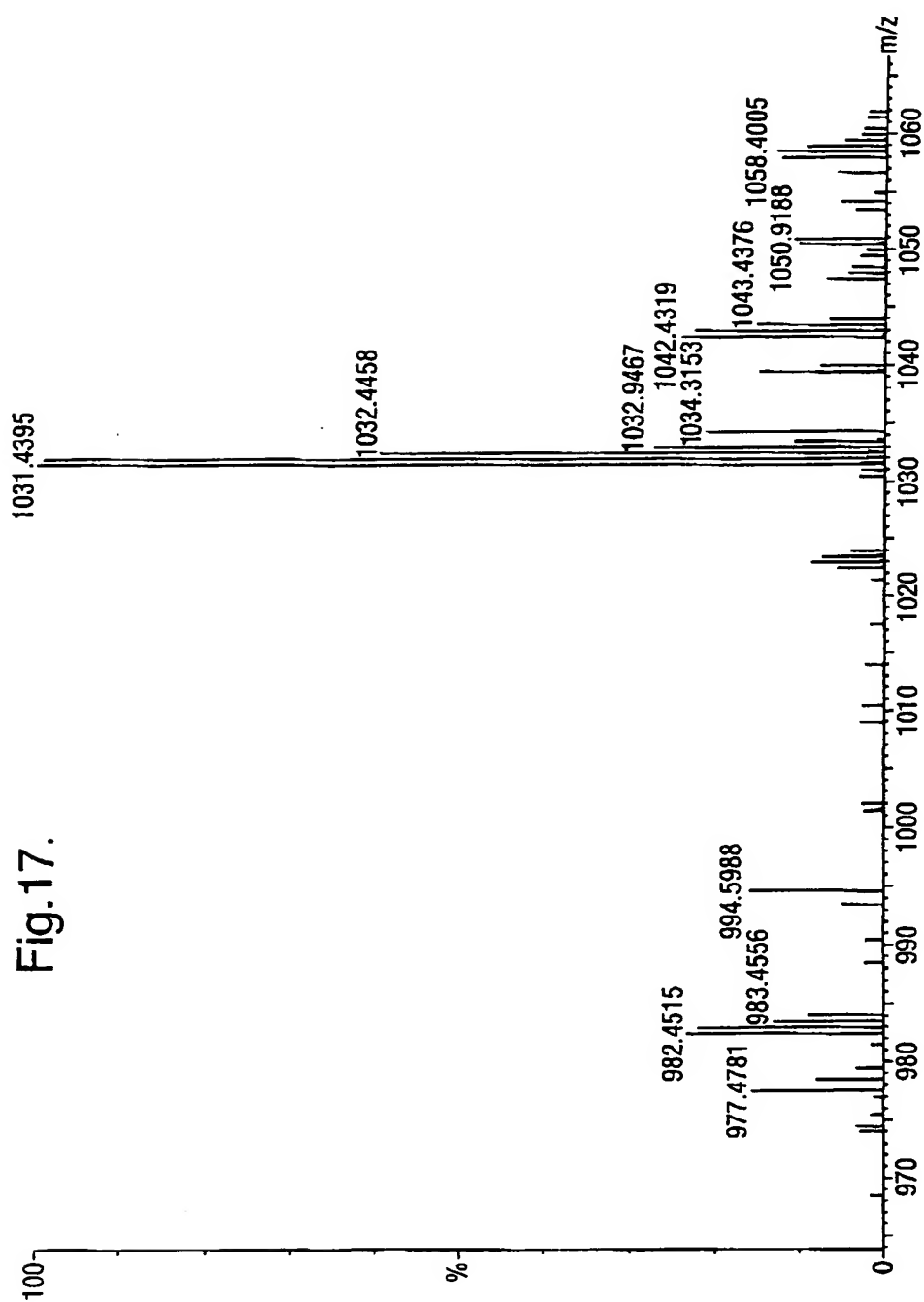
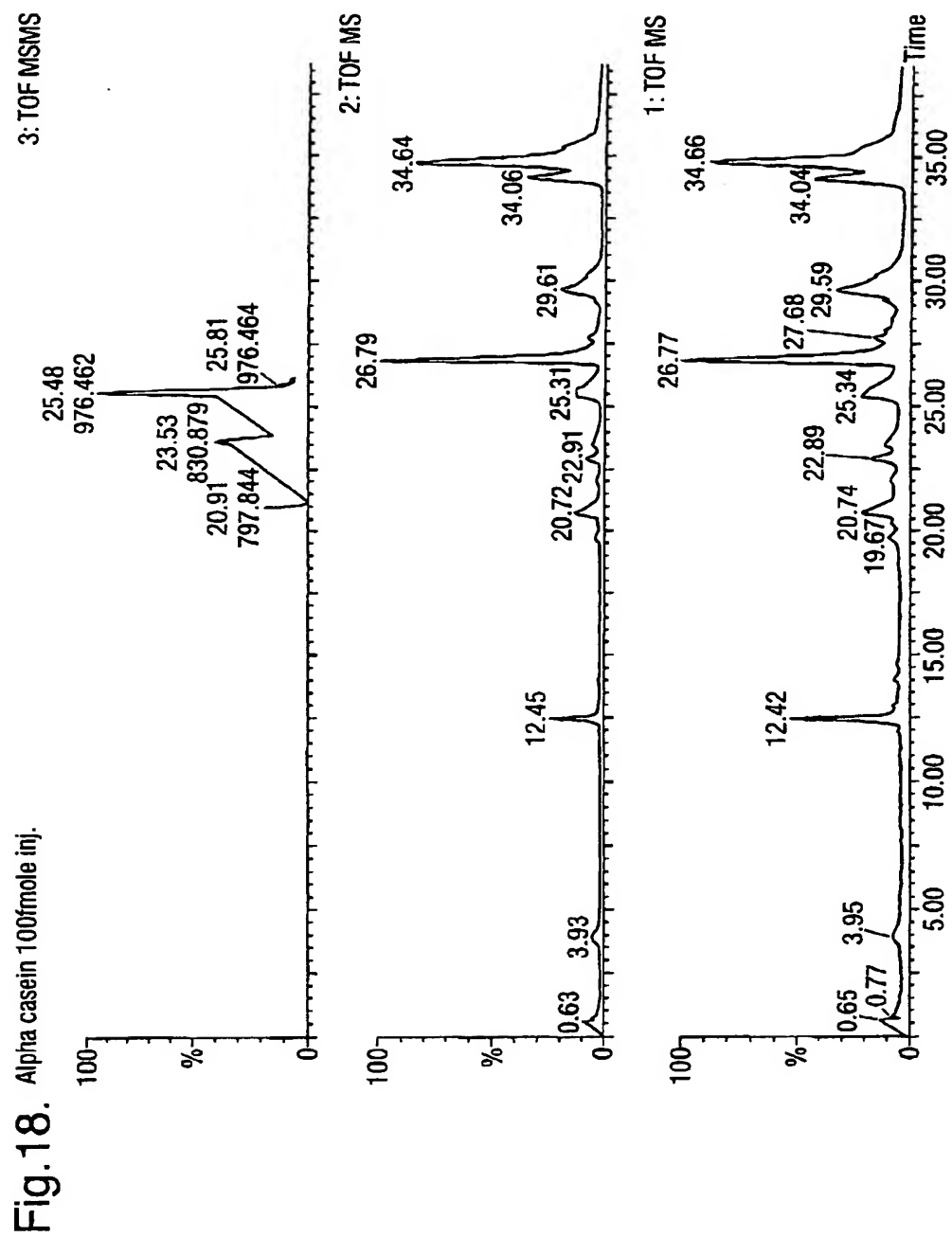


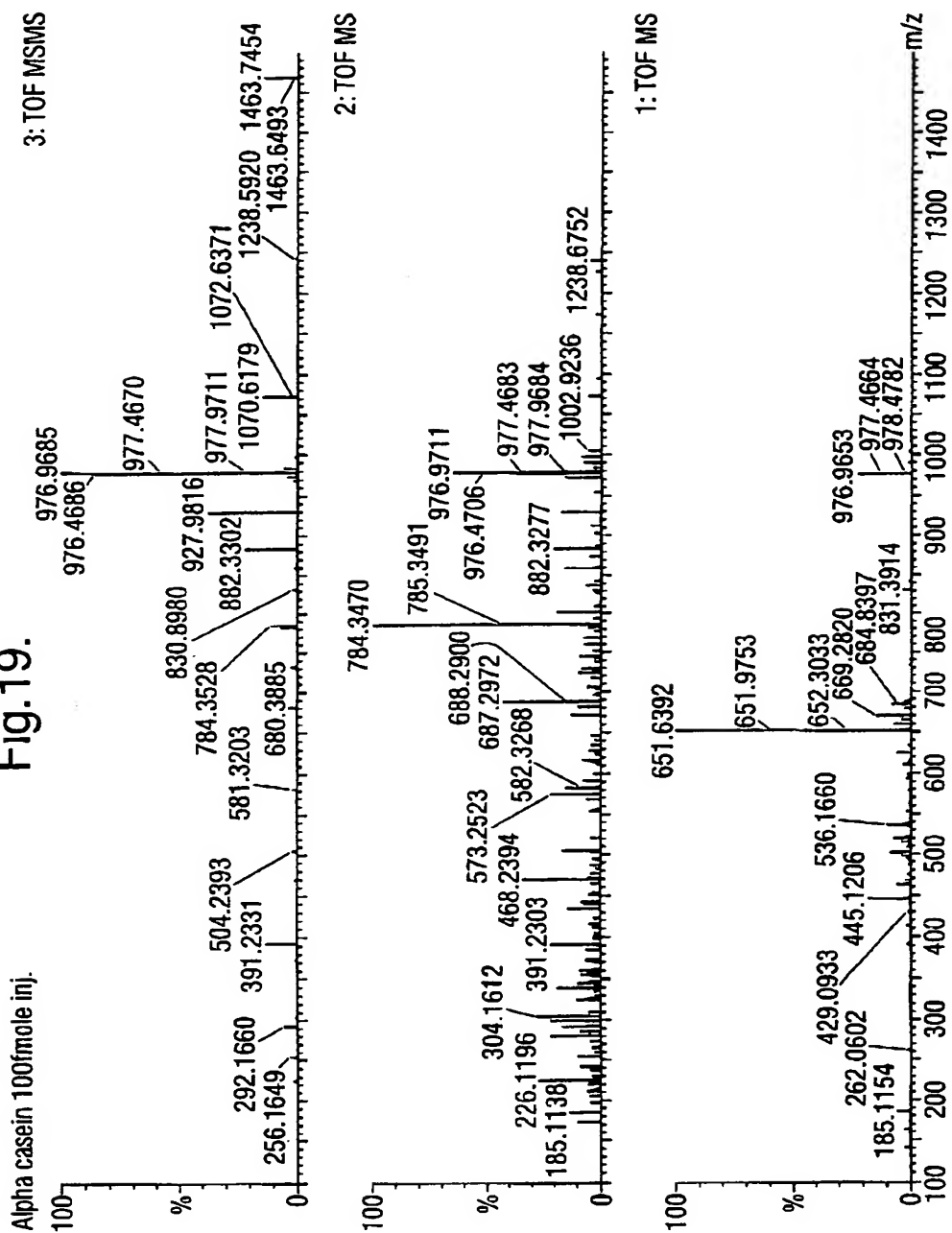
Fig.16.







**Alpha casein 100fmole inj.**



## 1 ABSTRACT

An improved method of parent ion scanning is disclosed. In one embodiment a quadrupole mass filter 3 upstream of a collision cell 4 is arranged to operate in a highpass mode. Parent ions transmitted by the mass filter 3 are fragmented in the collision cell 4 and detected by an orthogonal time of flight analyser 5 which obtains a daughter ion mass spectrum.

Ions having a mass to charge ratio below the cutoff of the mass filter 3 are identified as daughter ions, and candidate parent ions may then be discovered and their identity confirmed by obtaining corresponding daughter ion spectra. In a second embodiment, the collision cell 4 alternates between high and low fragmentation and candidate parent ions can additionally be identified on the basis of the loss of a predetermined ion or neutral particle.

## 2 REPRESENTATIVE DRAWING

Fig. 1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**